

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zu Protein-Interaktionspartnern
des HCN2 Schrittmacherkanals**

von
Heike Abicht
aus München

2004

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Absatz 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 12.01.2004

.....
(Unterschrift des Autors)

Dissertation eingereicht am 13.01.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel
2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Pfeifer

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2004

Für MaPaSoPe

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Martin Biel für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit an seinem Institut anzufertigen, die Reservierung eines „Nicht-Mäuse“-Themas für mich und für seine fachliche Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Alexander Pfeifer danke ich sehr für die Übernahme des Koreferates und die fachlichen Anregungen.

Mein Dank gilt Dr. Andrea Gerstner und Dr. Angela Schneider, die mich in Großhadern in die Laborarbeit eingeführt haben und immer ein offenes Ohr für Fragen aller Art hatten.

Danken möchte ich auch Berit Noack und Daniela Scholz für die nicht immer nur „technische“ Unterstützung im Laboralltag.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Barbara Much für die Durchsicht der Arbeit und die konstruktive Kritik daran, vor allem aber auch für die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Für das teilweise Korrekturlesen möchte ich mich auch vielfach bei Heidi Geiger und Dr. Christian Wahl-Schott bedanken.

Ebenfalls danken möchte ich Andreas Ludwig und Sven Moosmang für die Bereitstellung des Antikörpers gegen HCN2, sowie die Betreuung während meines Jahres am Biederstein. Für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft danke ich Herrn Prof. Dr. Hofmann und allen Mitarbeitern dort, hauptsächlich Norbert Klugbauer für die Aufnahme in seinem Büro und dem Rest vom „2. Stock“.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Biel und Pfeifer, mit denen immer auch Spaß neben der Arbeit möglich war.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich von ganzem Herzen, daß sie mich jederzeit bedingungslos unterstützt und sich in schwereren Zeiten rührend um mich gekümmert haben, und für alles, was man nicht in ein paar Zeilen ausdrücken kann.

Mein größter Dank gilt Peter Franzisky, den der gegen Ende zähe Fortschritt der Arbeit nicht aus der Ruhe gebracht hat, der mir seinen Rechner zur Verfügung stellte, sich (nicht nur) um die damit verbundenen Problemchen kümmerte und immer für mich da war (wenn nicht gerade im Ausland...).

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	<u>12</u>
1.1	DIE FUNKTION VON I_H : RHYTHMISCHE ERREGUNGSBILDUNG	12
1.2	DIE HCN KANALFAMILIE	15
1.2.1	STRUKTUR DER HCN KANÄLE	15
1.2.2	FUNKTIONELLE EIGENSCHAFTEN DER HCN KANÄLE	18
1.2.3	EXPRESSION DER HCN KANÄLE	20
1.3	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	23
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>24</u>
2.1	BAKTERIEN	24
2.1.1	VERWENDETE STÄMME	24
2.1.2	NÄHRMEDIEN UND ANTIBIOTIKA	24
2.1.3	KULTIVIERUNG	25
2.1.4	BESTIMMUNG DER ZELLDICHTE	25
2.2	VERWENDETE PLASMIDE	25
2.3	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA	25
2.3.1	SCHNELLISOLIERUNG VON PLASMID-DNA (ALKALISCHE LYSE)	25
2.3.2	PLASMIDISOLIERUNG UND –REINIGUNG DURCH SÄULENCHROMATOGRAPHIE	26
2.4	REINIGUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	27
2.4.1	PRÄZIPITATION VON NUKLEINSÄUREN	27
2.4.2	PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION	27
2.4.3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	27
2.5	ENZYMATISCHE MODIFIKATION VON DNA	28
2.5.1	RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	28
2.5.2	DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA DURCH ALKALISCHE PHOSPHATASE	28
2.5.3	PRIMER-ANNEALING	28
2.5.4	VERKNÜPFUNG VON DNA-FRAGMENTEN MIT T4-DNA-LIGASE	29
2.6	AUFTRENNUNG UND ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	29
2.6.1	LÖSUNGEN	29
2.6.2	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	30
2.6.3	POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	30
2.6.4	ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREFRAGMENTEN	31
2.6.4.1	durch Gelextraktion	31
2.6.4.2	durch Elektroelution	31
2.7	POLYMERASE-KETTENREAKTION	31
2.7.1	PRIMER	32

2.7.2	STANDARDPROTOKOLL	32
2.8	SEQUENZIERUNG VON DNA	33
2.8.1	PRIMER.....	33
2.8.2	SEQUENZIERREAKTION.....	34
2.9	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	35
2.9.1	VERWENDETE LÖSUNGEN	35
2.9.2	PRÄPARATION CHEMISCH KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN.....	35
2.9.3	TRANSFORMATION	35
2.9.3.1	von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> XL1 Blue Zellen.....	36
2.9.3.2	von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Zellen	36
2.9.3.3	von chemisch kompetenten One Shot® <i>E. coli</i> Zellen (TOPO TA Cloning®).....	36
2.9.3.4	von elektrokompenten <i>E. coli</i> XL1 Blue Zellen.....	36
2.10	ERSTELLUNG EINER CDNA-BIBLIOTHEK AUS MAUS-HERZ.....	37
2.10.1	ISOLIERUNG VON RNA.....	37
2.10.2	SYNTHESE EINZELSTRÄNGIGER CDNA.....	37
2.10.3	HERSTELLUNG DER CDNA-BIBLIOTHEK.....	38
2.11	ZWEI-HYBRID-SYSTEM	39
2.11.1	VERWENDETER STAMM.....	40
2.11.2	VERWENDETE PLASMIDE.....	40
2.11.3	VERWENDETE MEDIEN.....	41
2.11.4	VERWENDETE LÖSUNGEN	42
2.11.5	KULTIVIERUNG.....	43
2.11.6	KONSTRUKTION DES „BAITS“.....	43
2.11.7	VORVERSUCHE MIT DEM BAIT.....	43
2.11.7.1	Activation Assay	43
2.11.7.2	Repression Assay	44
2.11.7.3	Leu Requirement	44
2.11.8	TRANSFORMATION VON EGY 48 HEFEZELLEN	44
2.11.8.1	Quick and Easy TRAF0 Protokoll für die Vorversuche.....	44
2.11.8.2	Two Hybrid System TRAF0 Protokoll für die Bibliothekstransformation.....	45
2.11.8.3	High Efficiency TRAF0 Protokoll für den “Rescreen”.....	46
2.11.9	ERNTE DER BIBLIOTHEKS-TRANSFORMIERTEN HEFEZELLEN	47
2.11.10	„REPLATING EFFICIENCY“.....	47
2.11.11	DETEKTION POSITIVER KLONE	48
2.11.12	BESTÄTIGUNG DER INTERAKTIONEN	48
2.12	KULTUR EUKARYOTISCHER ZELLEN	49
2.12.1	VERWENDETE ZELLINIE	49
2.12.2	VERWENDETES NÄHRMEDIUM	50
2.12.3	VERWENDETE LÖSUNGEN	50
2.12.4	KULTIVIERUNG.....	50
2.12.5	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN MITTELS LIPOFEKTION	51

2.13	QUANTIFIZIERUNG VON PROTEINEN.....	51
2.14	WESTERN BLOT ANALYSE.....	52
2.14.1	VERWENDETE LÖSUNGEN	52
2.14.2	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE.....	53
2.14.3	COOMASSIE-FÄRBUNG	54
2.14.4	IMMUNOLOGISCHE DETEKTION DURCH WESTERN BLOT	54
2.15	KO-IMMUNPRÄZIPITATION	55
2.15.1	VERWENDETE LÖSUNGEN	56
2.15.2	ZELLKULTUR UND -LYSE	56
2.15.3	DURCHFÜHRUNG DER KO-IMMUNPRÄZIPITATION	56
2.16	GST PULLDOWN ASSAY	57
2.16.1	VERWENDETE LÖSUNGEN	58
2.16.2	KONSTRUKTION DES FUSIONSPROTEINS	58
2.16.3	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DES GST-FUSIONSPROTEINS	58
2.16.4	DURCHFÜHRUNG DES GST PULLDOWN ASSAYS	59
3	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>60</u>
3.1	KLONIERUNG DES KÖDERPROTEINS mHCN2-C	60
3.2	INTRA-mHCN2-INTERAKTIONEN	64
3.2.1	KLONIERUNG DER KONSTRUKTE	64
3.2.2	UNTERSUCHUNG DER INTERAKTIONEN MITTELS DES ZWEI-HYBRID-SYSTEMS	64
3.3	INTERAKTIONSPARTNER VON mHCN2	66
3.3.1	YEAST TWO HYBRID SCREEN.....	66
3.3.1.1	Präparation der cDNA-Bibliothek.....	67
3.3.1.2	Identifizierung von Interaktionspartnern.....	68
3.3.1.3	Bestätigung der Interaktionen	70
3.3.2	KO-IMMUNPRÄZIPITATION	75
3.3.2.1	Klonierung von myc-Fusionsproteinen.....	76
3.3.2.2	Ko-Immunpräzipitation von mHCN2 und PR65 sowie mHCN2 und Oracle.....	76
3.3.3	C-SRC ALS INTERAKTIONSPARTNER	78
3.3.3.1	Klonierung der Konstrukte in Hefektoren.....	78
3.3.3.2	Untersuchung der Interaktion mittels des Zwei-Hybrid-Systems	79
3.3.3.3	GST-Pulldown von SH3-GST und mHCN2	81
3.3.4	KLONIERUNG WEITERER KÖDERPROTEINE	82
3.3.4.1	Untersuchung der Interaktionen mittels des Zwei-Hybrid-Systems	83
3.3.4.2	GST-Pulldown von mHCN2-C5, -C6 und -C7 mit c-Src bzw. SH3	85
4	<u>DISKUSSION</u>	<u>90</u>
4.1	INTERAKTIONEN INNERHALB DES mHCN2.....	90

4.2	INTERAKTIONEN DES MHCN2 MIT PROTEINEN DER CDNA-BIBLIOTHEK.....	90
4.2.1	PR65.....	91
4.2.2	ORACLE / CYPHER.....	92
4.2.3	CVHSP UND PTP TD14	93
4.3	C-SRC ALS INTERAKTIONSPARTNER VON MHCN2	95
4.4	INTERAKTIONSBEREICH DES MHCN2.....	98
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>99</u>
<u>6</u>	<u>ANHANG</u>	<u>100</u>
6.1	RESTRIKTIONSENZYME	100
6.2	OLIGONUKLEOTIDE	100
6.3	DREI-BUCHSTABEN-CODE UND EIN-BUCHSTABEN-CODE DER AMINOSÄUREN:.....	104
<u>7</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>105</u>
7.1	ZITIERTER VERÖFFENTLICHUNGEN.....	105
7.2	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	115
<u>8</u>	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>116</u>

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AA / AS	amino acid / Aminosäure
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum-Albumin
CA	Cornu Ammonis / Ammonshorn
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CIP	calf intestine phosphatase / alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CNBD	cyclic nucleotide binding domaine / Zyklonukleotid-Bindungstasche
CNG	durch zyklische Nukleotide aktiviert
Da	Dalton
ddNTP	2'-3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DO	Drop out
DRG	dorsal root ganglion
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Natrium-ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EtOH	Ethanol
FBS	fetales Rinderserum
Gal	Galaktose
Glu	Glukose
GST	Glutathion-S-Transferase

h	Stunde(n), human
HCN	hyperpolarisations-aktiviert und zyklonukleotid-gesteuert
HEK	human embryonic kidney cells/menschliche embryonale Nierenzelllinie Klon293
His	Histidin
I _h	hyperpolarisationsaktivierter Strom
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
Lsg	Lösung
LTP	long term potentiation / Langzeitpotenzierung
m	murin
M	Mega (10 ⁶), molar
MCS	multiple cloning site / multiple Klonierungsstelle
MEM	minimum essential medium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MQ	Reinstwasser aus der Easypore-Anlage
nm	Nanometer
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction / Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PI	Protease-Inhibitor
Raff	Raffinose
rb	rabbit, aus dem Kaninchen stammend
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SH	Src homology domain
SS-DNA	Salmon sperm DNA / Lachssperma-DNA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Trp	Tryptophan
U	Unit / Einheit
üN	über Nacht
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
Vol	Volumeneinheit
w/v	weight per volume
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPAD	Yeast Peptone Adenin Dextrose
YPD	Yeast Peptone Dextrose

1 EINLEITUNG

Bei der Bildung rhythmischer Abfolgen von Aktionspotentialen spielen hyperpolarisations-aktivierte Kationenströme (I_h oder I_f , siehe unten) eine zentrale Rolle. Diese Abfolgen werden auch als Schrittmacherpotentiale bezeichnet und regulieren Prozesse wie den autonomen Herzschlag, die Atemfrequenz oder den Schlaf-Wachrhythmus (Pape, 1996).

1.1 Die Funktion von I_h : Rhythmische Erregungsbildung

Zum ersten Mal wurde ein langsamer, zeitabhängiger Einwärtsstrom in Sinusknotengewebe beschrieben, der durch Membranhypervolarisation aktiviert wird (Noma und Irisawa, 1976). Es folgte eine exakte Charakterisierung dieses Stromes, der daraufhin aufgrund seiner ungewöhnlichen Eigenschaften als I_f bezeichnet wurde, wobei das f für „funny“ steht (Brown *et al.*, 1979; Brown et DiFrancesco 1980). Wenige Zeit später wurde ein ähnlicher hyperpolarisationsaktivierter Kationenstrom in den Stäbchen des Auges (Bader *et al.*, 1979) und in pyramidalen Neuronen des Hippocampus (Halliwell und Adams, 1982) beschrieben, der als I_h bezeichnet wurde, wobei das h für „hyperpolarization activated“ steht.

Mindestens vier physiologische Rollen werden durch I_h vermittelt: (1) Kontrolle der Schrittmacher-Aktivität in Herz und Gehirn, (2) Kontrolle und Begrenzung des Ruhepotentials, (3) Kontrolle des Membranwiderstandes und der dendritischen Integration und (4) Regulation der synaptischen Übertragung.

I_h im Herz

In Vertebraten entsteht die kardiale Schrittmacheraktivität in einer eng begrenzten Region des Herzens, dem Sinusknoten. Die Schrittmacher sind spezialisierte Muskelzellen, die spontan Aktionspotentiale generieren können. Die entstandene elektrische Aktivität breitet sich über das gesamte Herz aus, was zur Kontraktion des Herzmuskels führt.

Mindestens vier verschiedene Ionenkanäle sind an der Entstehung des rhythmischen Herzschlags beteiligt: zwei verschiedene Typen von Calciumkanälen, ein Kaliumkanal und die Schrittmacherkanäle. Zuerst öffnen sich die Calciumkanäle vom T-Typ, gefolgt von den Calciumkanälen vom L-Typ, was zu einer starken Depolarisation der Zelle führt. Anschließend wird die Zelle durch die Öffnung der „delayed rectifier“ Kaliumkanäle repolarisiert. Wenn die Zellmembran am Ende jeden Aktionspotentials eine hyperpolarisierte Spannung von -50mV bis -60mV erreicht hat, öffnen sich die Schrittmacherkanäle, woraufhin Natrium in die Zelle einströmt, bis die Zellmembran langsam depolarisiert (spontane diastolische Depolarisationsphase), und die Schwelle zur Auslösung eines neuen Aktionspotentials erreicht wird.

Verschiedene funktionelle Eigenschaften verleihen dem nativen I_h die Fähigkeit, als Rhythmusgenerators während der Schrittmacherdepolarisation zu fungieren. Dazu gehören die Aktivierung durch Hypervolarisation, was I_h von den meisten anderen Ionenkanälen

unterscheidet, die Modulation durch zyklische Nukleotide, sowie die Leitfähigkeit für Kalium und Natrium, die mit einem Umkehrpotential von -20mV einen Einwärtsstrom unter Ruhepotentialbedingungen ermöglicht. Zusätzlich kann die spannungsabhängige Aktivierung von I_h von Transmittern und Hormonen über Second-Messenger-Systeme beeinflusst werden. Auf diese Besonderheiten wird später noch genauer eingegangen.

Für die Schrittmacherkanäle sind zwei Funktionen postuliert: die Initiierung rhythmischer Aktivität und die Regulation der Frequenz (Abb. 1.1-1). Eine Stimulation des Sympathikus bewirkt über die Aktivierung von β_1 -Rezeptoren die Bildung von cAMP. Der erhöhte cAMP Spiegel verschiebt die Aktivierungsschwelle des Kanals zu positiveren Potentialen, wodurch die Kanalaktivierung beschleunigt wird (DiFrancesco *et al.*, 1986; DiFrancesco und Tortora, 1991). Dies verkürzt die Depolarisationsphase, was zu einer Beschleunigung des Herzschlags führt. Ebenso kann nach Stimulation des Vagus durch die Erregung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren vom Typ M_2 der cAMP Spiegel in der Zelle sinken und die Schlagfrequenz verringert werden.

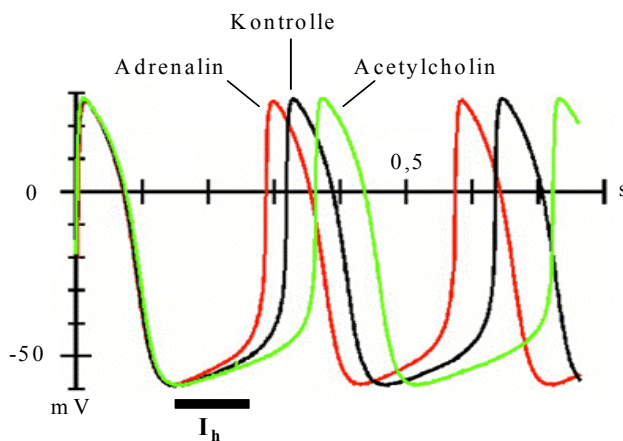


Abb. 1.1-1: Aktionspotentiale einer Sinusknotenzelle

Dargestellt sind Aktionspotentiale des Sinusknotens. Der schwarze Balken kennzeichnet zeitlich den I_h Einwärtsstrom für die Kontrolle (schwarze Kurve). Die grüne Kurve zeigt die Reduktion der Frequenz nach Applikation von Acetylcholin. Die rote Kurve zeigt die Erhöhung der Frequenz nach Applikation von Adrenalin.

I_h kommt nicht nur im Sinusknoten vor, sondern wurde auch in nachgeordneten Teilen des Reizleitungssystems (Noma *et al.*, 1980), in Purkinje Fasern (Di Francesco, 1981) und in einer Vielzahl von Neuronen dokumentiert (Pape, 1996; Lüthi und McCormick, 1998).

I_h im Gehirn

I_h kann fast überall im Zentralnervensystem gemessen werden (Pape, 1996) und erfüllt in den unterschiedlichen Neuronen verschiedene komplexe Funktionen. Dazu gehören die Determinierung des Ruhepotentials, die Integration von Reizen sowie die Beteiligung an der Gedächtnisbildung im Hippocampus.

In vielen Neuronen trägt I_h zur Stabilisierung und Determinierung des Ruhepotentials bei. Im Bereich des Ruhepotentials der meisten Neuronen ist I_h aktiviert und der resultierende Einwärtsstrom bewirkt ein Ruhepotential, das deutlich positiver als das Kalium-

Gleichgewichtspotential ist. In thalamokortikalen Neuronen ist das Ruhepotential in Abwesenheit von I_h um ca. 12mV zu negativeren Potentialen verschoben, in den CA1 Neuronen des Hippocampus ist der Unterschied geringer (Ludwig *et al.*, 2003). Über die cAMP vermittelte Zunahme von I_h kann das Ruhepotential noch weiter angehoben werden und liegt dann näher an der Schwelle für die Auslösung von Natrium- und Kalium-Aktionspotentialen. Über eine Hebung bzw. Senkung des Ruhepotentials kann somit die Erregbarkeit z.B. der Purkinjezellen des Kleinhirns, d.h. ihre Fähigkeit, auf eintreffende Reize zu reagieren, unabhängig von der synaptischen Plastizität moduliert werden (Nolan *et al.*, 2003).

Zusätzlich ermöglicht I_h die Integration von Reizen. In den CA1 Neuronen des Hippocampus nimmt die Stromdichte in den Dendriten mit zunehmender Entfernung vom Soma zu. Dendritischer I_h ist ein wichtiger Bestandteil der Antwort auf exzitatorische synaptische Inputs. Diese unterschiedliche Verteilung spielt eine Rolle bei der Weiterleitung von entfernt oder nah zum Soma eingehenden Reizen. Wahrscheinlich gelingt das durch eine Erhöhung der lokalen Leitfähigkeit in den Dendriten. Durch die Vereinheitlichung der zeitlichen Verläufe von entfernt oder nah zum Soma eingehenden Reizen erhöht sich die Leistungsfähigkeit des dendritischen Baumes zur Informationsverarbeitung (Robinson und Siegelbaum, 2003).

Auch in den Purkinjezellen spielt I_h eine Rolle bei der Integration. Ohne I_h verändert sich die Frequenz, mit der Purkinjezellen als Antwort auf eingehende Reize feuern, allerdings in Abhängigkeit vom Zustand der Purkinjezelle (feuernd oder ruhig) zum Zeitpunkt des eingehenden Reizes als auch von der Anzahl und der Geschwindigkeit der eingehenden Reize. Erst bei hoher Frequenz kommt es zu Ausfällen (Nolan *et al.*, 2003).

Ebenso wie im Herzen trägt I_h auch in manchen Neuronen zur Erzeugung rhythmischer Aktivität bei (Pape, 1996). Die konnte z.B. an thalamokortikalen Neuronen gezeigt werden, die in rhythmischen Abständen Salven von Aktionspotentialen feuern.

Ein ähnliches Phänomen konnte im Hippocampus beobachtet werden. Hier tritt eine charakteristische Oszillation, die im EEG erkennbar ist und als Theta-Rhythmus (4-8Hz) bezeichnet wird, im Zusammenhang mit einer Aufmerksamkeitsfokussierung auf neue Stimuli in den CA1 Neuronen auf.

Außerdem sind I_h Kanäle in den Moosfasern an den Synapsen zu CA3 Neuronen exprimiert. Dort sind sie aktiv beteiligt an der Erhaltung des Ruhemembranpotentials und kontrollieren hier die synaptische Übertragung durch die Kontrolle der Transmitterfreisetzung und der neuronalen Erregbarkeit. Die Aktivierung der präsynaptischen I_h Kanäle ist notwendig für die Induktion von LTP und somit an der Gedächtnisbildung beteiligt (Huang und Hsu, 2003).

1.2 Die HCN Kanalfamilie

1.2.1 Struktur der HCN Kanäle

Jahre nach der Charakterisierung des I_h konnten die Gene der Ionenkanäle, die dessen molekulare Grundlage darstellen, identifiziert werden (Santoro *et al.*, 1997, 1998; Ludwig *et al.*, 1998; Gauss *et al.*, 1998; Ishii *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1999; Seifert *et al.*, 1999). Um die Nomenklatur dieser neuen Genfamilie einheitlich zu gestalten, wurden die Kanäle als **hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels (HCN)** bezeichnet (Clapham, 1998; Biel *et al.*, 1999).

Bislang sind insgesamt vier Mitglieder der HCN Familie bei Säugetieren bekannt (HCN1-4). Strukturell weisen sie Ähnlichkeiten mit den CNG Kanälen sowie den Kaliumkanälen der EAG-Familie auf (Abb. 1.2-1 A).

Auf der Ebene der Aminosäuren weisen die vier HCN Kanäle untereinander eine hohe Homologie auf. Sie beträgt etwa 60% für die gesamte Länge der Kanäle, erhöht sich jedoch auf 80 – 90%, wenn man nur die „Kernregion“ (S1 - S6 und CNBD) betrachtet. Die Amino- und Carboxytermini alleine unterscheiden sich stark sowohl im Hinblick auf die Sequenz als auch auf die Länge (Abb. 1.2.-1 B).

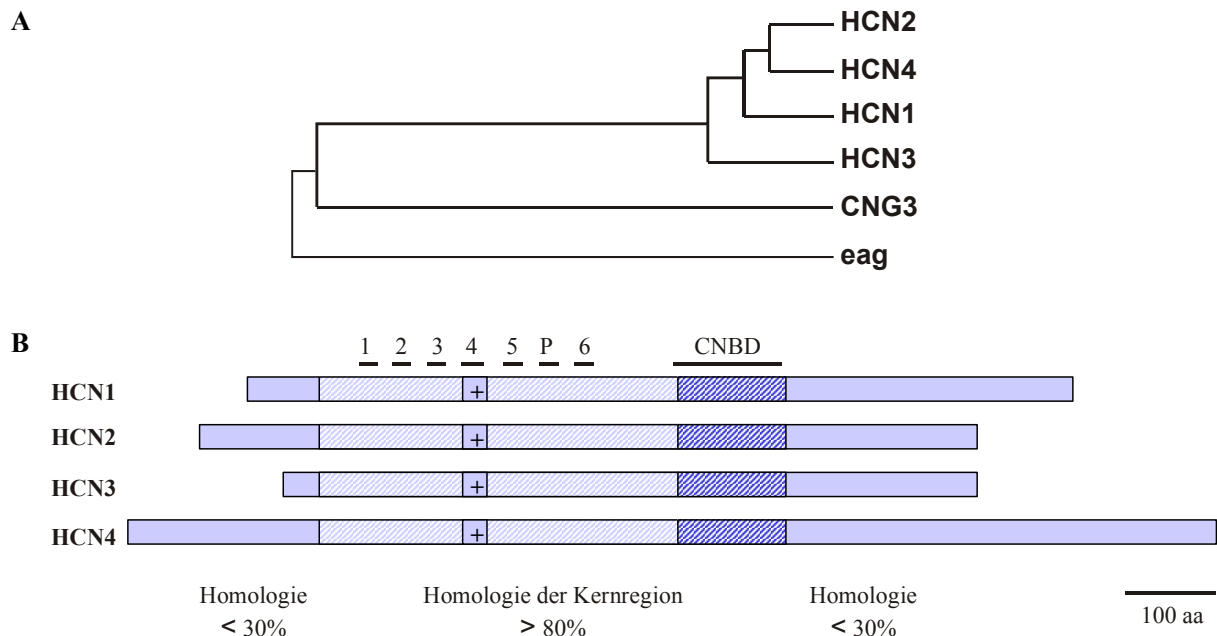


Abb. 1.2-1: Homologie und phylogenetischer Stammbaum der HCN Familie

(A) Phylogenetischer Stammbaum der HCN Kanäle, berechnet aus den Sequenzhomologien der Kernregion (S1-S6 und CNBD). Dargestellt sind auch die verwandtschaftlichen Beziehungen zu CNG Kanälen (als Beispiel CNG3) und zu Kaliumkanälen (als Beispiel eag).

(B) Die Abbildung zeigt ein stark vereinfachtes Schema der HCN Kanäle und gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Längen der N- und C-Termini. Die Lage der Transmembranbereiche (1-6), des positiven S4-Segmentes (+), der Pore (P) und der CNBD ist oberhalb gekennzeichnet. Die Homologie der Bereiche untereinander ist angegeben. Die Kernregion ist gestreift dargestellt.

Die HCN Kanäle zeigen den typischen Aufbau spannungsabhängiger Kationenkanäle. Sie enthalten sechs (putative) transmembranäre Helices (S1-S6) mit einem positiv geladenen S4 Segment, das den Spannungssensor darstellt, einer ionenleitenden Pore zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne und intrazellulär gelegenen N- und C-Termini. Im C-Terminus befindet sich eine Zyklonukleotidbindungsdomäne (CNBD), die über ein als „C-linker“ bezeichnetes Verbindungsstück mit S6 verbunden ist.

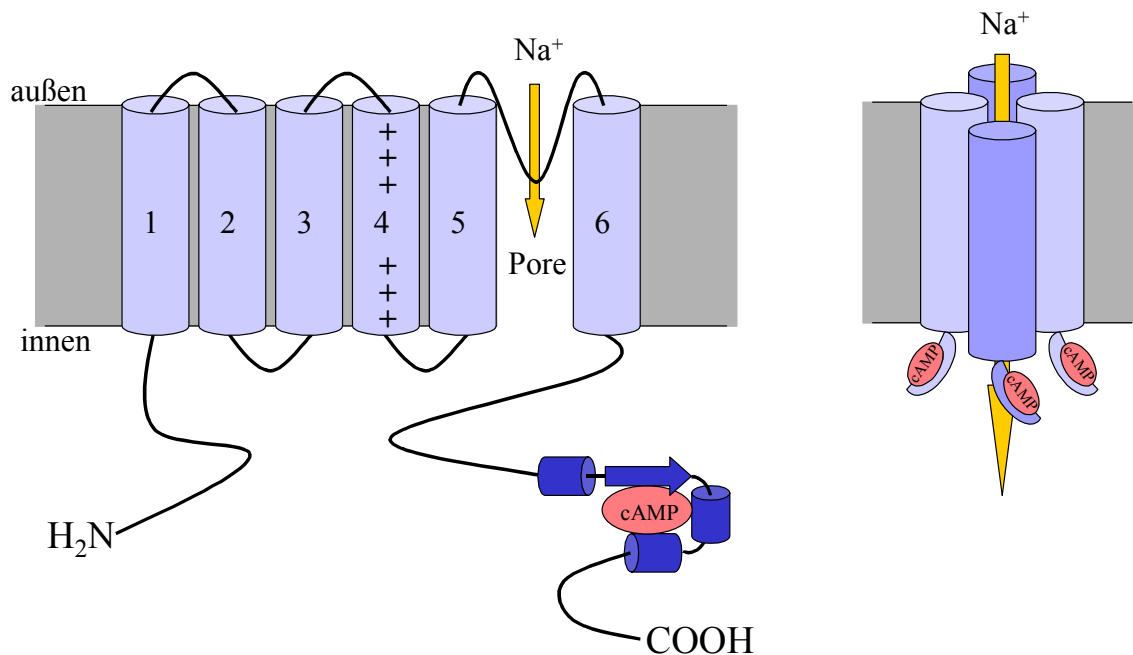


Abb. 1.2-1: Modell der Membrantopologie der HCN Kanäle

Die Abbildung zeigt links ein stark vereinfachtes Schema der Transmembrantopologie von HCN Kanälen mit sechs Transmembransegmenten (1-6), positiv geladenem S4 Segment als Spannungssensor, Pore zwischen S5 und S6, intrazellulärer CNBD sowie intrazellulärem N- und C-Terminus. Rechts ist ein Schema der vermuteten Heterotetramer-Struktur abgebildet. Vier HCN Untereinheiten ordnen sich um die ionenleitende Pore an. Die CNBDs von drei der vier Untereinheiten sind eingezeichnet.

Bezugnehmend auf die Röntgenstrukturanalyse des C-linkers und der CNBD eines HCN Kanals von Zagotta *et al.* (2003) wird vermutet, daß sich auch der transmembranäre Bereich des Kanals ähnlich komplex in der Zellmembran faltet (im Gegensatz zu obigem stark vereinfachten Modell).

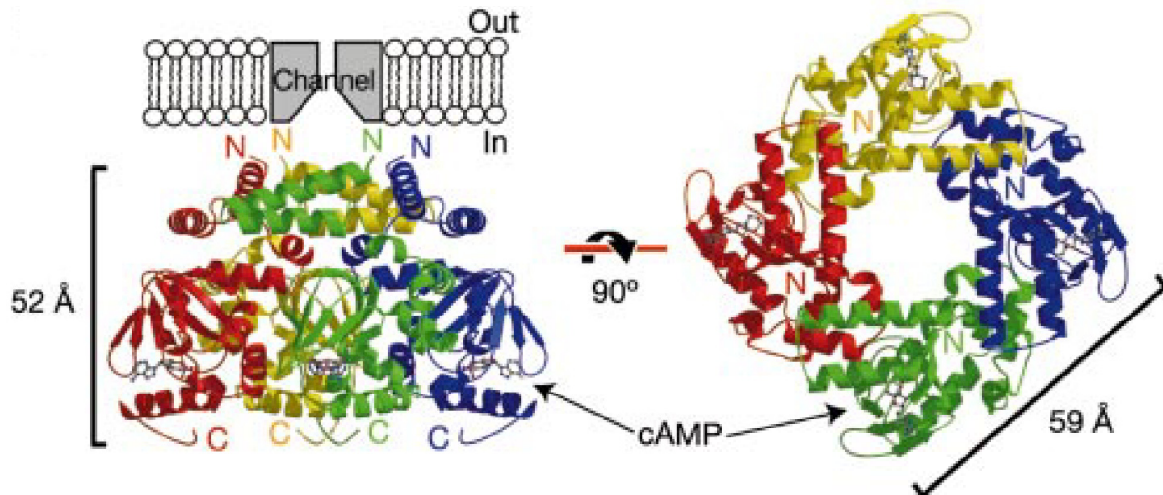


Abb. 1.2-2: schematische Abbildung der Topologie des C-linkers und der CNBD eines HCN Kanals

Die Abbildung zeigt Struktur des C-linkers und der CNBD mit gebundenem cAMP. Links sieht man das Tetramer von der Seite, rechts von extrazellulär. Jede der vier Untereinheiten ist in einer anderen Farbe dargestellt. (nach Zagotta *et al.*, 2003)

Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion sind bisher nur teilweise bekannt. Darauf wird in den entsprechenden Kapiteln noch eingegangen.

Die HCN Kanäle gehören zur Superfamilie der spannungsabhängigen Kationenkanäle. Kaliumkanäle aus dieser Familie assoziieren zu Tetrameren (Doyle *et al.*, 1998). Wie die CNG Kanäle besitzen die HCN Kanäle eine CNBD im zytoplasmatischen C-Terminus (Biel *et al.*, 1999). Aufgrund der engen Verwandtschaft sowie den Daten der Kristallstruktur des C-linkers und der CNBD von HCN Kanälen (Zagotta *et al.*, 2003) wird eine tetramere Anordnung für sehr wahrscheinlich gehalten. Alle vier HCN Typen können heterolog funktionell exprimiert werden. Die in einem solchen System elektrophysiologisch charakterisierten Ströme können jedoch nicht alle *in vivo* auftretenden Formen von I_h erklären. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Zusammensetzung der gebildeten Tetramere aus verschiedenen Isoformen der HCN Familie. Dafür spricht, daß sich die Gewebsexpression der einzelnen HCN Mitglieder im Hirn und im Herzen zumindest teilweise überlappt (1.2.3). Erste Hinweise fanden Ulens und Tytgat, indem sie ein dimeres Konstrukt aus HCN1 und HCN2 exprimierten, dessen Strom dem in CA1 pyramidalen Neuronen glich (2001). Weitere elektrophysiologische Daten, die die Bildung von Tetrameren und die Heteromerisierung zwischen HCN1 und HCN2 bestätigen, resultierten aus Versuchen mit einer negativ-dominanten Mutante des HCN1 (Xue *et al.*, 2002). Im Falle des mHCN2 konnte dem konservierten Abschnitt des N-Terminus (52AS) direkt vor der Transmembrandomäne S1 eine Rolle in der Aneinanderlagerung der Untereinheiten zugeordnet werden. Über diese Region vermögen mHCN2 Kanäle zu dimerisieren. Außerdem spielt diese Region eine wichtige Rolle in der funktionellen Expression des Kanals. Mutanten, in denen die 52 Aminosäuren entfernt worden waren, zeigten keine HCN2 Ströme mehr und lokalisierten nicht mehr in der Zellmembran, sondern im perinukleären Raum (Tran *et al.*, 2002).

Tatsächlich können die verschiedenen HCN Subtypen Heterotetramere in fast allen Kombinationen bilden (Ausnahme HCN2 mit HCN3) (Much *et al.*, 2003). Unklar bleibt die Stöchiometrie dieser Heterotetramere.

1.2.2 Funktionelle Eigenschaften der HCN Kanäle

Die herausragenden funktionellen Eigenschaften der HCN Kanäle sind die Aktivierung durch Hyperpolarisation, die Modulation durch zyklische Nukleotide sowie die Leitung von Natrium- und auch Kaliumionen. Diese Eigenschaften des nativen I_h lassen sich auch in HEK293 Zellen nachweisen, in denen heterolog HCN cDNA exprimiert wurde (Santoro *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 1998, 1999; Ishii *et al.*, 1999; Seifert *et al.*, 1999; Moosmang *et al.*, 2001).

Aktivierung durch Hyperpolarisation

Im Gegensatz zu den verwandten spannungsabhängigen Kalium-Kanälen werden die HCN Kanäle durch Hyperpolarisation, nicht durch Depolarisation, aktiviert. Trotzdem finden sich im S4 Segment 10 positiv geladene Aminosäurereste (Arginin und Lysin), wohingegen durch Depolarisation aktivierte Kalium-Kanäle nur fünf bis acht aufweisen. Die Entfernung von mehr als den ersten drei positiv geladenen Aminosäuren des Spannungssensors S4 durch Mutation resultiert in einem Verlust der Kanalfunktion, was auf deren Bedeutung als Spannungssensor schließen läßt. Einzelne Austausche dieser ersten drei Aminosäuren führen zu einer Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung um -20mV zu hyperpolarisierenden Werten (Vaca *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000). Auch bei Kalium-Kanälen dient S4 als Spannungssensor (Horn, 2002). Wenn der Kanal depolarisierenden Spannungsänderungen ausgesetzt wird, veranlassen die positiv geladenen Aminosäurereste in S4 eine korkenzieherartige Drehung der Helix in Richtung der Zellaußenseite, was die Öffnung des Kanals vermittelt. Die entgegengesetzte Bewegung zum Zellinneren hin bedingt die Schließung des Kanals. Ungeklärt blieb dabei die Frage, ob dieser Mechanismus bei den HCN Kanälen umgekehrt funktioniert. Männikkö *et al.* (2002) haben dies für den HCN Kanal des Seeigels (spHCN) beantwortet. Eine identische Bewegung des S4 Segments zum Zellinneren führt hier zur Öffnung des Kanals. Der Spannungssensor-Mechanismus ist also konserviert, sogar zwischen Kanälen, die durch Depolarisation oder Hyperpolarisation aktiviert werden. Für den HCN1 Kanal der Säugetiere wurden kürzlich zwei Mechanismen postuliert. Einerseits wird behauptet, daß sich S4 an sich nicht bewegt, sondern sich durch die Spannungsänderung die Transmembrandomänen S2 und S3 derart bewegen, daß sich die wässrige Spalte um S4 vergrößert (Bell *et al.*, 2004). Andererseits werden ähnliche Versuchsergebnisse so interpretiert, daß sich die α -Helix von S4 im N-terminalen Drittel entwindet, so daß der N-terminale Teil an der Membranaußenseite verbleibt, während sich der C-terminale Teil zum Zellinneren hin bewegt (Vemana *et al.*, 2004). Um zu verstehen, wie die Spannungsdetektion von S4 zu entgegengesetzten Effekten auf die Kanalöffnung führt, muß erst verstanden werden, wie die Bewegung um oder von S4 an die Kanalöffnung gekoppelt ist. Für die HCN Kanäle wird angenommen, daß der linker zwischen S4 und S5 eine Rolle in diesem Kopplungsmechanismus spielt (Chen *et al.*, 2001).

Nach heterologer Expression von HCN Kanälen in HEK293 Zellen wurden die elektrophysiologischen Charakteristika bestimmt. Als Kriterien dienten die Spannung der halbmaximalen Aktivierung sowie die Geschwindigkeit der Aktivierung.

Die halbmaximalen Aktivierungspotentiale $V_{1/2}$ werden durch Patch Clamp Experimente im „whole cell“ Modus gemessen und sind ein Maß für den Spannungsbereich, in dem die Kanäle aktiviert werden können. $V_{1/2}$ beträgt für HCN1 um die -90 mV, für HCN2 um die -100 mV, für HCN3 um die -95 mV und für HCN4 um die -100 mV.

Die HCN Kanäle aktivieren auch unterschiedlich schnell. Die Zeitkonstante τ wird durch Annäherung einer exponentiellen Funktion an die gemessene Aktivierungskurve berechnet. Durch einen Vergleich dieser Zeitkonstanten läßt sich feststellen, daß HCN1 ($\tau = 100\text{--}300$ ms; Santoro *et al.*, 1998, 2000) schneller aktiviert als HCN2 ($\tau = 200\text{--}500$ ms; Ludwig *et al.*, 1998), der wiederum schneller aktiviert als HCN4 ($\tau = 600$ ms bis mehrere sec; Ludwig *et al.*, 1999). Über HCN3 gibt es in der Literatur bisher nur ungenügend Daten. Die Aktivierungskinetik wird von verschiedenen Regionen der Kanäle beeinflusst (Ishii *et al.*, 2001).

Modulation durch zyklische Nukleotide

Zyklische Nukleotide, speziell cAMP, zu einem geringeren Teil auch cGMP, haben zwei verschiedene Effekte auf Schrittmacherkanäle. In physiologischen Konzentrationen ($K_a = 60\text{--}500$ nM) verschieben sie die Aktivierungskurve um $2\text{--}15$ mV zu positiven Potentialen (Ludwig *et al.*, 1998). Der Einfluß von cAMP auf die verschiedenen Subtypen weist große Unterschiede auf. HCN1 wird durch Bindung von cAMP kaum moduliert ($2\text{--}6$ mV, Santoro *et al.*, 1998), während sich die Aktivierungskurve von HCN2 um $12\text{--}14$ mV (Ludwig *et al.*, 1998), bei HCN4 sogar um $11\text{--}23$ mV (Ishii *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1999) zu positiveren Potentialen verschiebt. Wie oben erwähnt, wirkt cGMP wesentlich schwächer und zeigt vergleichbare Effekte nur in $10\text{--}100$ -fach höheren Konzentrationen ($K_a = 6$ μ M, Ludwig *et al.*, 1998) als cAMP. Zusätzlich beschleunigen zyklische Nukleotide die Aktivierungskinetik. Sie regulieren die Kanäle direkt durch Bindung an die CNBD im C-Terminus der Proteine. Dabei spielen einige Aminosäuren eine wichtige Rolle, die in der Röntgenstrukturanalyse von CAP (catabolite activator protein von *E. coli*) (Weber und Steitz, 1987) dicht am gebundenen cAMP Molekül liegen. Diese Aminosäuren sind auch in der CNBD der HCN Kanäle konserviert.

In Studien an Chimären aus HCN1 und HCN2 wurde gezeigt, daß die Modulation durch zyklische Nukleotide offenbar dadurch zustande kommt, daß durch Bindung von cAMP an die CNBD deren inhibitorischer Effekt auf den Kanal, der durch eine Interaktion mit der Kernregion bedingt ist, aufgehoben wird (Wainger *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Die strukturell zweigeteilte CNBD besteht aus einer β -Faltblatt-Domäne ($\beta_1\text{--}\beta_8$) und vier α -Helices (A, P, B, C). Mit Hilfe von Deletionsmutanten konnten Wainger *et al.* zeigen, daß die CNBD eine inhibitorische Wirkung auf die Kanalaktivierung hat und das „gating“ zu negativeren Potentialen verschiebt. Bindung von cAMP – oder die Deletion der gesamten

CNBD – hebt diese Inhibition auf. Eine Mutante, der der C-Terminus ab der C-Helix fehlt, bleibt im inhibierten Status gefangen, da die inhibitorische Domäne der CNBD noch vorhanden ist, die cAMP-Bindungsstelle jedoch fehlt. Unterschiede sowohl in der Spannungsabhängigkeit als auch in der cAMP Modulation zwischen den HCN Isoformen beruhen auf unterschiedlicher Inhibition der Kanäle durch ihre CNBDs.

Ein weiterer Modulationsmechanismus besteht darin, daß Spannungsabhängigkeit und Kinetik von I_h von der intrazellulären Protonenkonzentration abhängig sind (Munsch und Pape, 1999). Bei Untersuchungen an thalamokortikalen Neuronen wurde im sauren Milieu die Aktivierungskurve um 2–3mV zu negativeren Potentialen verschoben, im alkalischen Bereich um 4–5mV zu positiveren Potentialen, verglichen mit der Kontrolle. Diese Effekte waren unabhängig vom Adenylatzyklase-System und beruhten nicht auf einer Zunahme von intrazellulärem cAMP. Da bekannt ist, daß eine erhöhte Aktivität der Neuronen einhergeht mit einer langsamen intrazellulären Ansäuerung, könnte dieser Mechanismus zur Kontrolle des rhythmischen Feuerns durch Modulation von I_h dienen. Verantwortlich für die pH Abhängigkeit ist im HCN2 der Maus ein einzelner Histidin-Rest (His 321), der am Übergang vom Spannungssensor S4 zum zytoplasmatischen linker zwischen S4 und S5 liegt (Zong *et al.*, 2001).

1.2.3 Expression der HCN Kanäle

Die einzelnen HCN Subtypen werden in verschiedenen Geweben, vor allem in Herz, Gehirn und Retina, in unterschiedlicher Stärke exprimiert.

Expression im Herzen

Das Herz weist regionale Unterschiede in der HCN Expression auf.

Die wichtigste HCN Isoform im Herzen ist HCN4 im Sinusknoten, gefolgt von HCN2 (Moosmang *et al.*, 2001). HCN4 spielt im embryonalen Stadium die entscheidende Rolle bei der Generierung von Schrittmacheraktionspotentialen. HCN4 defiziente Mäuse sterben ebenso wie Mäuse, denen HCN4 selektiv in Kardiomyozyten fehlt, am Tag 11,5 der Schwangerschaft, was zeigt, wie essentiell HCN4 für die Ausbildung des kardialen Schrittmacherapparates ist (Stieber *et al.*, 2003). Reste von I_f , die in HCN4 defizienten Kardiomyozyten auftreten, werden wahrscheinlich von HCN1 und HCN3 generiert.

Die zweitwichtigste HCN Isoform ist HCN2, die hauptsächlich im Ventrikel exprimiert wird. Die Deletion des HCN2 Gens führt zu lebensfähigen Mäusen, die aber vom Sinusknoten ausgehende Arrhythmien, eine Reduktion des sinoatrialen I_f und eine Verlangsamung der Aktivierung aufweisen (Ludwig *et al.*, 2003). Eine kardiomyozyten-spezifische Deletion des Gens führt zu einem identischen Phänotyp, wodurch bestätigt werden konnte, daß die Effekte auf eine Insuffizienz des Sinusknotens zurückzuführen sind. HCN2 spielt hier eine wichtige Rolle in der Festlegung des Ruhemembranpotentials, das einen wichtigen Faktor zur Kontrolle von physiologischen Schrittmacherfunktionen ausmacht. Über die Zeit verändert sich die Expression verschiedener Isoformen im Ventrikel (Shi *et al.*, 2001). Nach der Geburt nimmt HCN2 zu, während HCN4 abnimmt.

Über die Expression von HCN1 gibt es unterschiedliche Angaben. Während Ludwig *et al.* in der Maus keinerlei mRNA nachweisen konnten (1998), beschreiben Shi *et al.* HCN1 als den am stärksten exprimierten Subtypen des Kaninchen-Herzens (1999). Von den Mäusen, denen HCN1 fehlt, wurde kein kardialer Phänotyp beschrieben (Nolan *et al.*, 2003), was auf einen geringen Anteil an der Funktion des Herzens schließen lässt.

Expression im Gehirn

In Gehirnen von Säugetieren (Maus, Ratte) konnte die Expression aller vier HCN Isoformen gezeigt werden. Meist beschränkt sie sich auf einzelne Regionen, lediglich HCN2 ist ubiquitär vorhanden (Moosmang *et al.*, 1999; Monteggia *et al.*, 2000; Santoro *et al.*, 2000). Alle Ergebnisse beruhen auf *in situ* Hybridisierung.

HCN1 Transkripte können im Gehirn im olfaktorischen Bulbus, im Cortex, im Hippocampus und im Cerebellum nachgewiesen werden. Im Hippocampus befinden sich die Kanäle überwiegend in den pyramidalen CA1 Neuronen, in den Neuronen des Stratum oriens und des Stratum radiatum. Im Gyrus dentatus beschränken sich die Signale auf die Neuronen der polymorphen Schicht, im Cerebellum auf die Korbzellen. Im neuronalen Gewebe außerhalb des Gehirns findet man HCN1 vor allem in den DRG Neuronen des Rückenmarks. HCN1 defiziente Mäuse weisen ein Lerndefizit auf (Nolan *et al.*, 2003), was sich hauptsächlich beim Erlernen schneller, sich wiederholender Bewegungsabläufe äußert. HCN1 scheint verantwortlich zu sein für die Integration von Inputs in den Purkinje Zellen des Cerebellum, unabhängig davon, ob sich die Zellen vorher in einem aktiven oder ruhigen Stadium befanden.

Die stärksten Signale von HCN2 findet man im olfaktorischen Bulbus, im Cortex, im Thalamus, im Hippocampus und im Cerebellum. Im Thalamus ist HCN2 vor allem in den exzitatorischen thalamokortikalen Relay Neuronen nachweisbar. Im Hippocampus wird HCN2 gleichmäßig in den pyramidalen CA1-3 Neuronen exprimiert, ebenso wie in den Neuronen des Stratum oriens, des Stratum radiatum und des Stratum lacunosum-moleculare. Im Gegensatz zu HCN1 kommt HCN2 im Gyrus dentatus nur in den Granula-Zellen vor. Im Cerebellum sind die Purkinje Neuronen stark gefärbt. In Mäusen führt die Deletion des HCN2 Gens zu spontanen Absence Epilepsien (Ludwig *et al.*, 2003). Die thalamokortikalen Relayneurone dieser Mäuse zeigen einen nahezu vollständigen Verlust von I_h , was zu einer Verschiebung des Membranruhepotentials zu deutlich negativeren Werten führt, woraus eine veränderte Antwort auf depolarisierende Inputs und eine erhöhte Sensibilität für Oszillationen resultiert. Dies weist auf die wichtigen Beitrag hin, den HCN2 zur Festlegung des Ruhemembranpotentials leistet.

Die beschriebene Expression von HCN3 ist im Gehirn gering. Nur im olfaktorischen Bulbus wurden Signale entdeckt, die sich allerdings nur schwach vom Hintergrund abheben.

HCN4 zeigt im Gehirn ein eng begrenztes Muster. Diese Untereinheit ist lediglich im olfaktorischen Bulbus, in der Habenula, im Thalamus und im Hippocampus nachweisbar. Im Hippocampus zeigt HCN4 ein ähnliches Expressionsmuster wie HCN2.

Auffällig ist bei der HCN Verteilung im Gehirn, daß sich die Bereiche, in denen HCN1 bzw. HCN2 und HCN2 bzw. HCN4 exprimiert werden, oft überlappen, während die Regionen, in denen HCN1 und HCN4 exprimiert werden, kaum übereinstimmen.

Insgesamt scheinen die Unterschiede in der Kinetik von I_h der verschiedenen neuronalen Typen die Verteilung der vier HCN Isoformen widerzuspiegeln. So wird in nativen Zellen der hippocampalen CA1 Neuronen, die eine sehr schnelle Kinetik zeigen, überwiegend HCN1 exprimiert. Thalamische Neuronen, die HCN2 und HCN4 exprimieren, weisen eine sehr langsame Kinetik auf.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Über die Regulation von HCN Kanälen ist abgesehen von ihrer Modulation durch cAMP nur sehr wenig bekannt. Für die Physiologie/Pharmakologie wäre es von großer Bedeutung, die Regulation dieser Kanäle zu verstehen, um über entsprechende Strukturen bei bestimmten Phänotypen (z.B. Arrhythmien) eingreifen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, Interaktionen des mHCN2 Kanals aufzuklären und neue Interaktionspartner zu identifizieren. Zu dieser Fragestellung wurde nach drei Ansätzen vorgegangen.

1. Die Klonierung verschiedener cDNAs, die die intrazellulären Bereiche des mHCN2 repräsentieren, ermöglichte die Untersuchung von Interaktionen zwischen den mHCN2 Untereinheiten bzw. eines Kanals mit Bestandteilen desselben Kanals. Ein Beispiel hierfür ist die Untersuchung der Interaktion zwischen CNBD und dem linker zwischen S4 und S5.
2. Um neue Interaktionspartner von mHCN2 zu identifizieren, wurde das Zwei-Hybrid-System in der Hefe angewandt („yeast two hybrid screen“). Als Köderprotein wurde der gesamte C-Terminus des mHCN2 (mHCN2-C) eingesetzt, der fast die Hälfte des Proteins ausmacht und zytoplasmatisch ein Ziel regulatorischer oder modulierender Proteine sein könnte. Da mHCN2 die vorherrschende Isoform im Ventrikel ist, wurde eine cDNA Bibliothek aus mRNA aus Herzen von Mäusen erstellt. Die Genprodukte dieser Bibliothek wurden anschließend mit dem Köderprotein auf potentielle Interaktoren untersucht. Nach der Identifikation von Interaktionspartnern sollten die Interaktionen mit unabhängigen Techniken wie der Ko-Immunpräzipitation oder dem GST-Pulldown bestätigt werden. Mittels Zwei-Hybrid-System und GST-Pulldown konnten die interagierenden Bereiche von mHCN2 und dem jeweils interagierenden Protein eingegrenzt werden.
3. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Aufklärung der Interaktion zwischen mHCN2 und der zellulären Isoform der Src-Kinase (c-Src). Elektrophysiologische Daten aus unserer Arbeitsgruppe ergaben Hinweise auf eine Regulation des mHCN2 durch c-Src, denen aus molekularbiologischer Sicht mittels Zwei-Hybrid-System und GST-Pulldown nachgegangen wurde. Außerdem war der HCN1 Kanal in einem Zwei-Hybrid-Versuch entdeckt worden, in dem die SH3 Domäne der neuronalen Isoform der Src-Kinase als Köderprotein eingesetzt worden war (Santoro *et al.*, 1997). Hier wurde erstmals die Interaktion der zellulären Src-Kinase sowie ihrer SH3-Domäne mit HCN2 untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterien

2.1.1 Verwendete Stämme

Organismus	Relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZβM15</i> Tn10 (TetR)]	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Novagen

2.1.2 Nährmedien und Antibiotika

Luria-Bertani-Medium (+)

Trypton	10g
Hefeextrakt	5g
NaCl	5g
Glukose	1g
H ₂ O	ad 1000ml
	pH7,2 – 7,5

SOC-Medium (-)

Trypton	20g
Hefeextrakt	5g
NaCl	0,5g
H ₂ O	ad 1000ml
	pH7,0

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Luria-Bertani-Vollmedium (LB) mit Glukose (LB(+)). Um frisch transformierte Bakterien nach der Elektroporation zu resuspendieren, wurde SOC-Medium nach Zugabe von 50µl 1M MgCl₂, 50µl 1M MgSO₄ und 100µl 20% Glukoselösung zu 4,8ml SOC(-)-Medium verwendet. LB(+)- und SOC(-)-Medium wurden zur Sterilisation für 20min bei 121°C und 1bar Überdruck autoklaviert, das LB(+)-Medium bei 4°C und das SOC(-)-Medium bei -20°C gelagert.

Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde dem LB(+)-Medium kurz vor dem Animpfen Antibiotikum zugegeben, entweder Ampicillin (Na-Salz, Roth) zu einer Endkonzentration von 100µg/ml oder Kanamycin (Sigma) zu einer Endkonzentration von 30µg/ml. Die wässrigen Stammlösungen (Amp: 50mg/ml, Kan: 10mg/ml) wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Für die Plattenkultur wurden dem LB(+)-Medium vor dem Autoklavieren 15g Agar/l (Roth) zugegeben. Das heiße Medium wurde im Wasserbad auf ca. 50°C abgekühlt, bevor das gewünschte Antibiotikum zugegeben und das Medium in sterile Petrischalen (Sarstedt) gegossen wurde. Die Ampicillin-Enkonzentration betrug hier 50µg/ml, für Kanamycin 30µg/ml.

2.1.3 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob in LB(+)-Medium. Die Flüssigkulturen wurden in Glasröhrchen oder Erlenmeyerkolben bei 37°C und 225rpm in einem Schüttler (Certomat IS, B. Braun Biotech International) inkubiert. Zur kurzfristigen Aufbewahrung und um Einzelkolonien zu erhalten, wurden Bakteriensuspensionen auf LB(+)-Platten ausplattiert bzw. Klone ausgestrichen, bei 37°C inkubiert und bei 4°C bis zu 8 Wochen gelagert. Zur längeren Aufbewahrung wurden logarithmisch wachsende Kulturen mit einem Volumen autoklavierten Glycerols (Merck) gemischt und bei –80°C eingefroren.

2.1.4 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde durch photometrische Trübungsmessung bei 600nm bestimmt. Steriles LB(+)-Medium diente als Referenzlösung.

2.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Selektionsmarker	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pcDNA3	Amp ^R , Neo ^R	f1 origin	Expressionsvektor	Invitrogen
pcDNA3.1MycHis	Amp ^R , Neo ^R	f1 origin, myc-tag, His-Tag	Expression von myc-Fusionsproteinen	Invitrogen
pCR2.1 [®] -TOPO [®]	Amp ^R , Kan ^R	f1 origin, <i>lacZα</i>	Zwischenklonierung von PCR-Produkten	Invitrogen
pBlueskript II KS	Amp ^R	f1 origin, <i>lacZ</i> , T3/T7pro	Zwischenklonierung des Baits	Stratagene
pET41a	Kan ^R	f1 origin, <i>lacI</i> , GST-tag, His-tag	Expression von GST-Fusionsproteinen	Novagen
pRSET-A	Amp ^R	f1 origin, pUC origin, 6x His-Tag	Expression von His-/myc-Fusionsproteinen	Invitrogen

2.3 Isolierung von Plasmid-DNA

2.3.1 Schnellisolierung von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse)

Für eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNA wurden die plasmidtragenden Bakterien in NaOH/SDS lysiert, wobei Proteine und DNA denaturieren (Birnboim und Doly, 1979). Durch anschließende Neutralisation mit Kaliumacetat renaturiert die relativ kleine Plasmid-DNA wieder, während das wesentlich größere Bakterienchromosom denaturiert bleibt und mit den übrigen Zelltrümmern abgetrennt werden kann. Die lösliche Plasmid-DNA wurde mit

Isopropanol gefällt und durch Waschen mit 70% EtOH von Salzen gereinigt, die in Isopropanol unlöslich sind.

Mit einer Einzelkolonie von *E. coli* wurde eine 7ml LB(+)-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10min bei 2000xg und RT geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 250µl Resuspensionspuffer MP1 (50mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA, 100µg/ml RNaseA) gelöst und in ein cap überführt. Nach Zugabe von 250µl Lysepuffer MP2 (200mM NaOH, 1% SDS) wurde der Ansatz gut gemischt und für 5min bei RT inkubiert. Zur anschließenden Neutralisation kam es durch Zugabe von 250µl Puffer MP3 (3M Kaliumacetat pH5,5), woraufhin die Zelltrümmer nach 15minütiger Inkubation auf Eis durch Zentrifugation für 15min bei 16000xg und 4°C abgetrennt wurden. Die Plasmid-DNA im klaren Überstand wurde mit Isopropanol gefällt, das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und nach Trocknung in 40µl MQ aufgenommen.

Dieses schnelle Verfahren ermöglicht die Untersuchung von vielen Klonen auf der Suche nach korrekten rekombinanten Klonen, da mit der gewonnenen Plasmid-DNA Restriktions- und Sequenzanalysen durchgeführt werden konnten.

2.3.2 Plasmidisolierung und –reinigung durch Säulenchromatographie

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA im großen Maßstab wurde die Plasmidpräparation mit dem Maxiprep-Kit Nucleobond AX-500 (Macherey-Nagel Düren) durchgeführt. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (2.3.1) gefolgt von einer chromatographischen Reinigung über eine Anionenaustauscher-Säule.

Mit einer Einzelkolonie von *E. coli* wurde eine 7ml LB(+)-Vorkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Mit dieser Vorkultur wurden 100ml LB-Medium mit Antibiotikum beimpft und über Nacht bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (10min, 5000xg, 4°C). Als Pellet ist eine Lagerung bei –20°C möglich. Das Bakterienpellet wurde in 12ml Puffer S1 (50mM Tris/HCl, 10mM EDTA, 100µg/µl RNaseA, pH8, Lagerung bei 4°C) resuspendiert und in ein Polycarbonat-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 12ml S2 (200mM NaOH, 1% SDS) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5min bei RT inkubiert. Zur anschließenden Neutralisation kam es durch Zugabe von 12ml Puffer S3 (2,8mM Kaliumacetat pH5,1), woraufhin die Zelltrümmer nach 15minütiger Inkubation auf Eis in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert wurden (40min, 25000rpm, 4°C). Während der Zentrifugation wurde die AX 500 Säule mit 6ml Puffer N2 (100mM Tris, 15% EtOH, 900mM KCl pH6,3, 0,15% Triton X-100) äquilibriert. Der klare Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wurde auf die äquilibrierte Säule gegeben und zweimal mit 16ml Puffer N3 (100mM Tris, 15% EtOH, 1,15M KCl pH6,3) gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 15ml Puffer N5 (100mM Tris, 15% EtOH, 1M KCl pH6,3) in Corex-Röhrchen eluiert, mit 10,5ml Isopropanol gefällt und für 30min bei 10000xg und 4°C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 5ml 70% EtOH gewaschen und nach erneuter Zentrifugation unter Vakuum getrocknet. Die hochreine DNA wurde in 500µl

MQ gelöst und zur Konzentrationsbestimmung photometrisch bei 260nm vermessen. Durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung wurde die Qualität überprüft.

Die auf diese Weise gereinigte DNA wurde für PCR-Reaktionen, für die Transfektion von HEK293 Zellen oder die Transformation von Hefezellen und als Ausgangsmaterial zur Konstruktion neuer rekombinanter Plasmide verwendet.

2.4 Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.4.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden zur Aufkonzentrierung und Reinigung mit Ethanol gefällt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde der wässrigen Nukleinsäurelösung 0,1Vol 5M NaAc pH5,2 und 2,5Vol 96% EtOH zugefügt und der Ansatz für 15min bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die gefällte DNA für 15min bei 16000xg und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% EtOH gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde für 5min in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac) getrocknet und in wenig MQ gelöst.

2.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Durch eine Phenol/Chloroform Extraktion werden Proteine, z.B. Enzyme, aus wässrigen Nukleinsäurelösungen entfernt. Dazu wurde der wässrigen Nukleinsäurelösung 1Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) zugefügt, der Ansatz bis zur Emulsionsbildung kräftig geschüttelt und für 5min bei 16000xg und RT zentrifugiert. Durch anschließende Chloroform-Extraktion wurde die wässrige Oberphase, die die Nukleinsäuren enthält, von Phenolresten befreit. Die Nukleinsäuren wurden mit EtOH präzipitiert (2.4.1).

2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um eine quantitative Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäurelösung (nach Clark und Swika, 1977) vornehmen zu können, wurde ein Aliquot mit MQ verdünnt und in einem Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf) vermessen. Nukleinsäuren absorbieren elektromagnetische Strahlung im Bereich von 250–270nm, was auf die aromatischen Ringsysteme der DNA-Basen zurückzuführen ist. Somit kann die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration durch Extinktionsmessung unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes erfolgen. Cryer fand 1975 näherungsweise folgende Zusammenhänge:

doppelsträngige (ds) DNA: $1 \text{ OD}_{260\text{nm}}$ entspricht $\cong 50\mu\text{g/ml}$

einzelsträngige (ss) DNA: $1 \text{ OD}_{260\text{nm}}$ entspricht $\cong 20\mu\text{g/ml}$

einzelsträngige (ss) RNA: $1 \text{ OD}_{260\text{nm}}$ entspricht $\cong 40\mu\text{g/ml}$

Verunreinigungen der Nukleinsäurelösungen konnten durch Bestimmung der Extinktion bei 230, 260 und 280nm bestimmt werden. Als Maß für eine ausreichende Reinheit der isolierten Nukleinsäuren sind folgende Quotienten als Richtwerte (Marmur 1961, Sambrook *et al.*, 1989) zu bestimmen:

$$E_{260}/E_{280} \geq 1.8 \text{ (Verunreinigung durch Proteine)}$$

$$E_{260}/E_{230} \geq 2.2 \text{ (Verunreinigung durch RNA)}$$

2.5 Enzymatische Modifikation von DNA

2.5.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen bilden eine Klasse bakterieller Enzyme, die spezifische Sequenzen in Doppelstrang-DNA erkennen und spalten können (Sambrook *et al.*, 1989). Die hier verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten ihr Substrat innerhalb oder unmittelbar neben der meist palindromischen Erkennungssequenz. Bei der Spaltung entstehen entweder glatte Enden (blunt ends) oder einander komplementäre, 5'- bzw. 3'-überhängende Enden (sticky ends) bekannter Sequenz. Die DNA-Enden besitzen immer eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe, was die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation, 2.5.4) kompatibler Enden ermöglicht. Restriktionsenzyme werden durch einen Buchstabencode nach dem Organismus benannt, aus dem sie isoliert wurden. Die verwendeten Enzyme der Fa. NEB, die Erkennungssequenzen, die entsprechenden Puffer, sowie die Inkubationstemperaturen sind im Anhang (6.1) aufgeführt.

Der Restriktionsansatz wurde bei optimaler Temperatur für 1,5h (analytischer Ansatz) bzw. 3-15h (präparativer Ansatz) inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch überprüft bzw. Fragmente isoliert. Eine Einheit (1U) Restriktionsendonuklease entspricht der Menge Enzym, die nötig ist, um 1µg DNA in einer Stunde unter optimalen Bedingungen quantitativ zu schneiden.

2.5.2 Dephosphorylierung von DNA durch alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = calf intestine phosphatase) spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von DNA-Molekülen ab. Linearisierte Vektoren wurden dephosphoryliert, um einen intramolekularen Ringschluß während der Ligation zu verhindern, wodurch die Klonierungseffizienz von Fremd-DNA erhöht wurde.

Das im präparativen Maßstab linearisierte Plasmid wurde mit 10U CIP (NEB) und 0,1Vol 10xNEB3 versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA über ein Agarosegel gereinigt (2.6.2), eluiert und für Ligationsansätze (2.5.4) verwendet.

Der Restriktionsverdau wurde angewandt, um Vektoren und Inserts für eine Ligation kompatibel zu machen und um isolierte Plasmid-DNA auf die richtige Größe des ligierten Inserts zu überprüfen.

2.5.3 Primer-Annealing

Um kleine DNA-Fragmente definierter Sequenz zu erhalten, die sich nicht über ein PAGE aufreinigen ließen, wurden zwei komplementäre Primer gelegt, deren Aneinanderlagerung zu doppelsträngiger DNA mit überstehenden Enden, definierten Schnittstellen entsprechend, führten. Dazu wurden beide Primer (kinasiert) auf 10pmol/µl verdünnt und 1:1 in ein cap

pipettiert und für 2min bei 75°C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde etwas Wasser aus dem Bad in einem Becherglas entnommen und die caps darin bis zur Abkühlung auf RT stehen gelassen. Dabei bildeten sich doppelsträngige DNA-Stücke aus. Über die vorgegebenen Schnittstellen konnte das kurze Fragment in einen Vektor ligiert werden.

2.5.4 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Die T4-DNA-Ligase (NEB) katalysiert ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxyende von doppelsträngigen DNA-Fragmenten (Weiss *et al.*, 1968). Als Substrat dienen sowohl überhängende als auch glatte Enden.

400U Ligase, linearisierter und mit CIP behandelter Vektor und Fremd-DNA wurden mit 1/10Vol 10xLigasepuffer gemischt, auf das entsprechende Volumen mit MQ aufgefüllt, und für 16h (üN) bei 16°C (oder 3h bei 25°C) im Wasserbad inkubiert. Anschließend konnte das rekombinante Plasmid durch Transformation (2.9.3) in *E. coli* eingeschleust werden.

2.6 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer Ladung in einem elektrischen Feld in einer Matrix (Agarose oder Polyacrylamid) ihrer Größe und Konformation nach (linear, offenzirkulär, superhelikal) aufgetrennt und ihrer Reinheit entsprechend bewertet werden. Die negative Ladung der Nukleinsäuren resultiert aus dem Zucker-Phosphat-Rückgrat und läßt sie zur Anode wandern. Kleinere Moleküle haben dabei eine höhere Laufgeschwindigkeit als große. Zur Kontrolle des Verlaufs der Elektrophorese wurden dem Auftragspuffer farbige Marker zugegeben: Bromphenolblau, das je nach Prozentigkeit des Gels ungefähr auf der Höhe von DNA-Fragmenten von 10–100 bp wandert, und Xylencyanol, das in etwa auf der Höhe von 5kb-Banden läuft. Die aufgetrennten DNA-Fragmente können durch Interkalation des Fluoreszenz-Farbstoffs Ethidiumbromid, welches der Gelmatrix zugefügt wurde, unter UV-Bestrahlung ($\lambda = 302\text{nm}$) als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Die Abschätzung der Fragmentgrößen und -konzentrationen wurde durch den Vergleich von Laufstrecken und Fluoreszenzintensitäten mit einem DNA-Standard (1kb ladder, Gibco) ermöglicht.

2.6.1 Lösungen

Probenpuffer 6xdye		10xTBE	
Ficoll Typ 400 (Sigma)	18%	Tris (Roth)	0,9M
EDTA pH8,0	0,12M	Borsäure (Roth)	0,9M
10xTBE	60ml	EDTA pH8,0 (Roth)	20mM
Bromphenolblau (Merck)	0,15%		
Xylencyanol FF (Sigma)	0,15%		
Lagerung: -20°C			

Ethidiumbromidstammlösung

10mg/ml (Roth)

Elektrophoresepuffer 1xTBE

10xTBE

1T

H₂O

9T

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Größen zwischen 1kb und 10kb wurde eine horizontale Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach Bedarf kamen analytische oder präparative Gele (8x8cm) mit Prozentigkeiten von 0,7% bis 2% zum Einsatz. Zu deren Herstellung wurden zwischen 0,35g und 1g Agarose (Roth) in 50ml 1xTBE im Mikrowellenherd aufgekocht, bis sie vollständig gelöst waren. Um die DNA später sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 800ng/ml zugegeben, nachdem das Gel im Wasserbad auf 50°C abgekühlt war, und die Mischung in eine Gelwanne mit Kamm gegossen (Sambrook *et al.*, 1989).

Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit der entsprechenden Menge 6xdye versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V mit 1xTBE als Laufpuffer, bis die zwei Farbmärker das Gel ungefähr in Drittel teilten. Als Größenvergleich wurden auf jedes Gel 700ng 1kb ladder aufgetragen. Mit Hilfe eines elektronischen Bilderfassungsgerätes der Firma Biorad (Gel Doc 2000) wurden die Gele dokumentiert.

2.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Kleinere DNA-Fragmente (Größen zwischen 50bp und 1000bp) wurden durch vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Die 5%igen Gele hatten eine Trennstrecke von 15cm und auch hier wurde 1xTBE als Laufpuffer verwendet.

Komponente	analytisches Gel (0,75mm dick)	präparatives Gel (1,5mm dick)
Rothiphoresegel (Verhältnis Acrylamid/NN'-Bisacrylamid= 29:1, 40%, Roth)	3,75ml	6,25ml
10xTBE	3ml	5ml
APS (Sigma)	80µl	133µl
TEMED (Sigma)	35µl	58µl
MQ	ad 30ml	ad 50ml

Die Mischung wurde vorsichtig gemischt und ohne Luftblasen zügig zwischen 2 Glasplatten gegossen.

Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit der entsprechenden Menge 6xdye versetzt. Die Elektrophorese erfolgte für 10min bei 100V, anschließend für 50min bei 260V. Als Größenvergleich wurden auf jedes Gel 700ng 1kb ladder aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 5min in Ethidiumbromidlösung (0,5µg/ml) gefärbt und mit Hilfe eines elektronisches Bilderfassungsgerätes der Firma Biorad (Gel Doc 2000) dokumentiert.

2.6.4 Isolierung von Nukleinsäurefragmenten

Für verschiedene Abläufe ist es wichtig, bestimmte DNA-Fragmente aus einem Gemisch wieder zu isolieren. Dazu gab es zwei Möglichkeiten.

2.6.4.1 durch Gelextraktion

Um ein bestimmtes DNA-Fragment nach der Agarose-Gelelektrophorese wieder aus dem Gel zurückzugewinnen, wurde das GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham) verwendet. Die DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Pro 10mg Gel wurden 10µl Capture Buffer in das cap mit dem Gelstück pipettiert und für ca. 10min bei 60°C im Wasserbad inkubiert, bis das Gel geschmolzen war. Die Lösung wurde kurz abzentrifugiert, auf eine der mitgelieferten Säulen pipettiert und für 1min bei RT stehen gelassen. Die Säule wurde daraufhin für 1min bei 16000xg zentrifugiert, der Durchfluß verworfen und die Matrix mit 500µl Waschpuffer gewaschen. Jetzt wurde die Säule in ein neues steriles cap gesetzt, mit dem gewünschten Volumen MQ für 1–30min bei RT inkubiert und die DNA durch erneute Zentrifugation eluiert.

2.6.4.2 durch Elektroelution

Durch Elektroelution konnte ein bestimmtes DNA-Fragment nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wieder aus dem Gel zurückzugewonnen werden. Die DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit 300µl 1xTBE in einen ausgekochten Dialyseschlauch (Sigma) überführt. Die DNA wurde für 1,5h bei 145mA in einer horizontalen Elektrophoresekammer auf Eis eluiert. Anschließend wurde sie durch Ethanolfällung präzipitiert und weiter verwendet.

2.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) (Saiki *et al.*, 1988) ist ein *in vitro*-Verfahren zur spezifischen Vervielfältigung definierter DNA-Bereiche. Eine Reihe von Temperatur-Zeitzyklen ermöglicht diese Amplifikation. Dabei wiederholen sich die Denaturierung der DNA, das Anlagern der Primer und die Verlängerung der Primer mittels einer DNA abhängigen DNA-Polymerase immer wieder. Bei der Denaturierung werden die Doppelstränge der DNA durch hohe Temperatur aufgeschmolzen. Beim Annealing binden die Primer, die in großem molaren Überschuß im Reaktionsansatz vorhanden sind, an die komplementären Zielsequenzen. Es werden zwei Oligonukleotid-Primer benötigt, die an den Enden der zu vervielfältigenden Sequenz liegen und spezifisch an den kodierenden bzw. den

nicht-kodierenden Strang der DNA binden. Ausgehend von diesem kurzen doppelsträngigen Bereich wird in der Elongationsphase der Einzelstrang in 5'→3'-Richtung von der Polymerase komplementär synthetisiert. Eine zyklische Wiederholung dieser drei Einzelschritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) bewirkt eine exponentielle Vermehrung des von den Primerbindungsstellen begrenzten DNA-Abschnitts. Auf diese Weise lassen sich spezifische PCR-Fragmente generieren, die für weitere molekulargenetische Arbeiten verwendet werden können.

Bei dieser Amplifikation wird durch die verwendete Polymerase (*Taq* Polymerase, Promega) am 3'-Ende des Amplifikats in der letzten Elongationsphase template-unabhängig ein Adenin-Nukleotid angehängt. Diese Eigenschaft erlaubt die T-Vektor Klonierung (z. B. pCR2.1[®]-TOPO[®], Invitrogen), da dieser Vektor ein 3'-terminales, überhängendes Thymidin-Nukleotid besitzt und somit eine Ligation von Vektor und Template möglich ist.

Für diese Arbeit wurde die PCR zur Konstruktion des Baits (2.11.6), zur Amplifikation von kompletten Genen aus einzelsträngiger cDNA (2.10.2) sowie zur Reklonierung der im Hefe-Screen gefundenen positiven Interaktionspartner (2.11.12) angewandt.

2.7.1 Primer

Die verwendeten PCR-Primer waren Oligonukleotide von 17-46bp Länge (6.2). Sie wurden von der Fa. MWG-Biotech (Ebersberg, D) synthetisiert, HPSF (*High purified saltfree*)-gereinigt und in lyophilisierter Form geliefert. Die Primer wurden in der für eine Konzentration von 100pmol/μl angegebenen Menge MQ gelöst und vor Verwendung noch 1:10 auf 10pmol/μl verdünnt. Die Annealingtemperatur ist abhängig von der Länge und der Zusammensetzung des Oligonukleotids und lässt sich mit der „2 + 4“-Regel (Suggs *et al.*, 1981) näherungsweise bestimmen:

$$T_M [^{\circ}\text{C}] = \{2 \times (\text{A} + \text{T}) + 4 \times (\text{G} + \text{C})\}$$

Bei Primern, denen eine Schnittstelle hinzugefügt wurde, werden nur komplementäre Basen für diese Berechnung berücksichtigt.

2.7.2 Standardprotokoll

Reaktionsansatz *Taq*

Primer 1 (10pmol/μl)	2,5μl
Primer 2 (10pmol/μl)	2,5μl
dNTP (je 1,25mM; Roth)	8μl
10 x <i>Taq</i> -Puffer	5μl
Plasmid-DNA	20ng
<i>Taq</i> (Promega) (5U/μl)	1μl
H ₂ O	ad 50μl

Reaktionsansatz <i>Taq</i>		2xMasterAmp™ PCR PreMix (Epicentre)	
Primer 1 (10pmol/μl)	2,5μl	Tris-HCL pH8,3	200mM
Primer 2 (10pmol/μl)	2,5μl	KCl	100mM
Premix J (Epicentre)	25μl	each dNTP	400μM
cDNA	1μl	MgCl ₂	3-7mM
<i>Taq</i> (Promega) (5U/μl)	1μl	MasterAmp PCR Enhancer	0-8x
H ₂ O	18μl		

Die PCR wurde in einem Thermo Cycler (Biometra) durchgeführt. Als template (Matrize) dienten 10-20ng Plasmid oder ca. 1μg wässrige cDNA. Für die Amplifikation wurde die thermostabile *Taq*-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* verwendet.

Die aufeinanderfolgenden Zyklen setzten sich wie folgt zusammen und wurden 25-35x wiederholt (außer primäre Denaturierung und finale Elongation):

Primäre Denaturierung	94°C, 1-4min		
Denaturierung		94°C,	
Annealing		50-70°C,	
Elongation		72°C,	
Finale Elongation			72°C, 5min

Die Dauer der primären Denaturierung richtet sich nach der Art des templates (kürzere Zeit für Plasmide, längere Zeit für genomische DNA). Die Elongationszeit richtet sich nach Polymerase und Länge des zu amplifizierenden Stückes. Die *Taq*-Polymerase synthetisiert ca. 1000bp/min. Die Temperaturen für das Primer-Annealing wurden an die jeweils verwendeten Oligonukleotide angepaßt.

2.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchs von Sanger *et al.* (1977). DNA-Fragmente wurden mittels „Terminator Cycle Sequencing“ enzymatisch synthetisiert und durch den Einbau verschieden fluoreszenzmarkierter 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) terminiert. Die Mischung der DNA-Fragmente aller möglichen Längen wurde durch Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt und anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzen ausgewertet.

2.8.1 Primer

Die verwendeten PCR-Primer waren Oligonukleotide von 17-46bp Länge (6.2). Sie wurden von der Fa. MWG-Biotech (Ebersberg, D) synthetisiert, HPSF (*High purified saltfree*)-

gereinigt und in lyophilisierter Form geliefert. Zur Kontrolle der für die Klonierung verwendeten Schnittstellen und der terminalen Sequenz wurden Einheitsprimer verwendet, die komplementär zur entsprechenden Vektorsequenz waren. Für große Fragmente wurden sequenzspezifische Primer gewählt. Die Bindungsposition der Primers lag ungefähr 20bp vor der zu identifizierenden Sequenz.

2.8.2 Sequenzierreaktion

Reaktionsansatz

DNA (300-500ng)	1µl
Primer (10pmol/µl)	1µl
MQ	7,5µl
Ready Reaction Mix (Perkin Elmer)	2,5µl

Im Ready Reaction Mix sind dNTPs, ddNTPs (fluoreszenzmarkiert, fluoreszieren bei verschiedenen Wellenlängen: ddGTP: 540nm, ddATP: 570nm, ddTTP: 600nm, ddCTP: 630nm) und die *Taq*-Polymerase in geeignetem Puffer enthalten. Um komplizierte Sekundärstrukturen zu lösen, wurde dem Ansatz gegebenenfalls 1µl DMSO zugesetzt. Das Terminator Cycle Sequencing wurde in einem Thermo Cycler (Biometra) nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	95°C	2min	} 25x
Denaturierung	95°C	30s	
Annealing	50°C	40s	
Elongation	60°C	4min	

Um nicht eingebaute fluoreszierende Nukleotide vom Reaktionsprodukt abzutrennen, wurden die DNA-Fragmente mit Ethanol präzipitiert. Anschließend wurde das Pellet in 30µl TSR (Template suppression reagent, Perkin Elmer) gelöst und vor der Analyse im Sequenzierautomaten (ABI Prism 310) für 3min bei 95°C denaturiert. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden unter Spannung (12,2kV) durch eine polymergefüllte Kapillare aufgetrennt und die Reihenfolge durch einen Laserdetektor registriert, die von der ABI PrismTM 310 Collection/Sequencing Analysis Software in die Nukleotidsequenz umgesetzt wurde.

2.9 Transformation von Bakterien

2.9.1 Verwendete Lösungen

Puffer A:		Puffer B:	
KAc	30mM	MOPS	10mM
CaCl ₂	10mM	CaCl ₂	75mM
KCl	100mM	KCl	10mM
MnCl ₂	50mM	Glycerol	15%
Glycerol	15%		

Der pH-Wert der MOPS-Lösung wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Beide Puffer wurden sterilfiltriert.

2.9.2 Präparation chemisch kompetenter Bakterienzellen

Kompetenz bezeichnet den physiologischen Zustand, der Bakterienzellen befähigt, exogene DNA aufzunehmen. Bei der hier beschriebenen Methode wird die Zellmembran der Bakterien durch Calciumchlorid für Makromoleküle permeabel gemacht (chemische Kompetenz).

Aus einem Glycerolstock, der bei -80°C gelagert wird, wurden mit einer ausgeglühten Impföse *E. coli* XL1 Blue Zellen (Stratagene) entnommen und in 1ml LB-Medium resuspendiert. Aus dieser Bakteriensuspension wurde mit erneut abgeflammter Impföse ein Verdünnungsausstrich auf einer Tetracyclin-Platte ($12\mu\text{g/ml}$) angefertigt und die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Nachmittag wurde von der Platte ein Klon abgenommen, in ein Reagenzglas mit 7ml LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Am folgenden Morgen wurde 1ml der Bakterienkultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100ml LB(-)-Medium überimpft und bei 37°C und 225rpm so lange inkubiert, bis die $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 0,3 betrug (ca. 1–4h). Anschließend wurden die Bakterien in autoklavierten 500ml Zentrifugenbechern für 6min bei $5000\times g$ und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in 25ml Puffer A resuspendiert und 1h auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen wieder zentrifugiert (5min, $5000\times g$, 4°C) und in 4ml Puffer B resuspendiert. Aus dieser Bakterienlösung wurden Aliquots von $105\mu\text{l}$ in vorgekühlte 1,5ml Eppendorfgefäße schockgefroren (EtOH/Trockeneis) und bei -80°C gelagert. Um die Transformationseffizienz zu überprüfen, wurde eine Testtransformation mit 1ng pUC18 durchgeführt und ausgezählt.

2.9.3 Transformation

Die Aufnahme fremder DNA in eine Bakterienzelle wird als Transformation bezeichnet. Bakterien, die rekombinante DNA aufgenommen haben, geben das Plasmid bei geeignetem Selektionsdruck stabil an ihre Tochterzellen weiter und können durch die auf dem Plasmid codierte Resistenz auf entsprechenden Medien selektioniert werden.

2.9.3.1 von chemisch kompetenten *E. coli* XL1 Blue Zellen

Für jede Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. 10µl des Ligationsansatzes (1/10 Volumen der Zellen) wurde zu den Zellen pipettiert, vorsichtig mit der Pipettenspitze verrührt und anschließend das cap für 30min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock, bei dem die Zellen für genau 45sec in ein Wasserbad mit 42°C getaucht wurden. Durch den Hitzeschock wird die Phase der DNA-Aufnahme beendet. Nachdem die Zellen für 2min auf Eis abgekühlt waren, wurden 900µl LB- oder SOC-Medium zupipettiert und das cap im Schüttler für 1h bei 37°C und 145rpm inkubiert. Nachdem die Zellen auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert worden waren, wurden sie über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.9.3.2 von chemisch kompetenten *E. coli* BL21 (DE3) Zellen

Die kompetenten *E. coli* BL21 (DE3) Zellen (Novagen) wurden zu je 20µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für jede Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut. 0,5µl des gereinigten Plasmids (siehe 3.4.2.) (hier: pET41a +/- Insert, pRSET-Amc +/- Insert) wurde zu den Zellen pipettiert, vorsichtig mit der Pipettenspitze verrührt und das cap für 5min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock, bei dem die Zellen für genau 30sec in ein Wasserbad mit 42°C getaucht wurden, um die DNA-Aufnahme zu beenden. Danach wurden die Zellen nochmals für 2min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 80µl SOC-Medium zu den Zellen pipettiert, und diese für 1h bei 37°C und 225rpm inkubiert. Nachdem die Zellen auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum plattiert worden waren, wurden sie über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.9.3.3 von chemisch kompetenten One Shot[®] *E. coli* Zellen (TOPO TA Cloning[®])

Für die effektive Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten wurde das TOPO TA Cloning[®] Kit von Invitrogen verwendet. Für die Ligation wurden 0,5-4µl mit 1µl Salzlösung, MQ (bis zu einem Volumen von 5µl) und 1µl TOPO[®]-Vektor zusammenpipettiert und für 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2µl des Ligationsansatzes zu den kompetenten One Shot[®] *E. coli* Zellen pipettiert, vorsichtig gemischt und für 5-30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30sec bei 42°C wurden die Zellen für weitere 2min auf Eis inkubiert, mit 250µl SOC-Medium versetzt und für 1h bei 225rpm und 37°C geschüttelt. Nachdem die Zellen auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum plattiert worden waren, wurden sie über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.9.3.4 von elektrokompetenten *E. coli* XL1 Blue Zellen

Für die Transformation einer cDNA-Bibliothek in *E. coli* wurden wegen der höheren Effizienz elektrokompetente Zellen verwendet. Um bei der Elektroporation einen Kurzschluß zu vermeiden, muß die DNA-Lösung vollkommen salzfrei sein. Dafür wurden 20µl Ligationsansatz mit 5µg tRNA versetzt und mit 12,5µl 7,5M NH₄OAc und 70µl EtOH gefällt. Nach einer Zentrifugation für 20min bei 13000rpm und RT wurde die DNA zweimal mit 70%

EtOH gewaschen, anschließend getrocknet und in 2µl MQ aufgenommen. Die elektrokompenten Zellen wurden in Eiswasser aufgetaut und 40µl davon zu der DNA pipettiert. Nach 1min auf Eis wurde der Ansatz auf den Boden einer gekühlten Elektroporationsküvette (0,2cm Elektrodenabstand, Biorad) pipettiert und im gekühlten Küvettenhalter einem Elektroschock (2,5kV, 25µF) ausgesetzt. Danach wurde den Zellen sofort 1ml SOC(+)-Medium zupipettiert, und die Zellen für 1h bei 225rpm und 37°C inkubiert. Um die Transformationseffizienz beurteilen zu können, wurden 5µl der Zellen mit 500µl LB-Medium gemischt, davon 50µl und 150µl auf zwei Platten ausplattiert und am nächsten Tag ausgezählt. Von der restlichen Zellsuspension wurden 500µl mit 200µl Glycerol und 300µl LB-Medium gut gemischt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

2.10 Erstellung einer cDNA-Bibliothek aus Maus-Herz

2.10.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von totaler RNA aus Herzgewebe von *M. musculus* wurde das peqGOLD TriFast™ Reagenz von peqlab Biotechnologie GmbH verwendet. Je 50–100mg des frisch präparierten oder bei -80°C gelagerten Gewebes wurden in 1ml peqGOLD TriFast™ mit dem Ultra-Turax T8 (IKA Labortechnik) unter einem Abzug homogenisiert. Die Probe wurde für 5min bei RT stehen gelassen, um eine Dissoziation der Nukleotid-Komplexe zu gewährleisten. Für jeden eingesetzten ml peqGOLD TriFast™ wurden 0,2ml Chloroform zugegeben, der Ansatz für 15s stark geschüttelt und anschließend 3–10min bei RT stehen gelassen. Eine anschließende Zentrifugation für 5min bei 12000xg führte zur Trennung der Probe in drei Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA war ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, während sich die DNA und die Proteine in der Interphase und der Phenolphase befanden. Die wässrige Phase wurde in frische sterile caps überführt und die RNA mit 0,5ml 100% Isopropanol pro eingesetztem ml peqGOLD TriFast™ präzipitiert. Die Probe wurde gemischt und für 10min bei RT inkubiert. Im Anschluß wurde für 10min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert, worauf sich das RNA-Präzipitat von gelartiger Konsistenz am unteren Ende der caps befinden sollte. Nachdem der Überstand vorsichtig abgenommen worden war, wurde das Pellet zweimal mit je 1ml 75% Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation wie oben gewaschen. Das RNA-Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde die RNA in 70µl DEPC-Wasser pro cap durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst und sofort bei -80°C gelagert. Die Ausbeute betrug 1,6µg Gesamt-RNA pro 1mg Gewebe. Die auf diese Weise gewonnene RNA wurde zur Herstellung von cDNA verwendet.

2.10.2 Synthese einzelsträngiger cDNA

Um aus RNA komplementäre DNA zu erhalten, wurde die Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco BRL) verwendet. Dabei handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-

Polymerase. Hierzu wurden 5µg RNA mit 1µl eines DNase-Mixes (bestehend aus 1µl DNase (Roche, 10U/µl), 1µl 10xPCR-Puffer, 1µl RNAsInh (Roche, 40U/µl) und 7µl MQ), 2µl 25mM MgCl₂, 2µl 10xPCR-Puffer, 1µl 0,1M DTT und 6,5µl MQ_{DEPC} gemischt. Nach 30min bei 37°C und 5min bei 75°C wurde das Gemisch auf 4°C abgekühlt und 1µl oligo(dT)-Primer (0,5µg/µl) zugegeben. Dadurch bilden sich ausgehend von den poly(A)-Schwänzen der mRNA-Moleküle doppelsträngige Bereiche aus, an denen die Reverse Transkriptase in Anwesenheit von dNTPs mit der Synthese der cDNA-Stränge beginnen kann. Der Reaktionsansatz wurde für 10min auf 70°C geheizt, und nach erneutem Abkühlen wurden 1µl 10mM dNTPs und 1µl 0,1M DTT zupipettiert. Nach 5min bei 42°C wurde 1µl der Superscript II Reversen Transkriptase zugegeben und 50min bei 42°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5min auf 90°C erhitzt, um die Polymerase zu inaktivieren, nach 10min bei 4°C mit 1µl RNaseH versetzt und für 20min bei 37°C inkubiert. Dadurch wurde der RNA-Anteil aus dem gebildeten RNA/DNA-Hybrid entfernt. Die synthetisierte cDNA wurde als Template für verschiedene PCR-Ansätze eingesetzt.

2.10.3 Herstellung der cDNA-Bibliothek

Für den Interaktionsscreen mittels des Zwei-Hybrid-Systems (2.11) wurde eine cDNA-Bibliothek hergestellt. Eine cDNA Bibliothek stellt eine Sammlung von DNA Kopien einer mRNA Population dar, die in einem geeigneten Klonierungsvektor in *E. coli* vermehrt wurden.

Je 3µg poly(A) RNA wurden in 2 parallelen Ansätzen in zwei Schritten mit dem SuperScriptTM Choice System for cDNA Synthesis (Gibco BRL) in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Der erste cDNA Strang wurde durch eine Reverse Transkriptase unter Verwendung von „random hexamer“-Primern (5'-NNNNNN-3') synthetisiert. Der zweite Strang wurde in einer Nick-Translations-Reaktion durch den Einsatz von *E. coli* DNA-Ligase, DNA-Polymerase I und RNase H (Okayama und Berg, 1982) hergestellt. Überhängende einzelsträngige cDNA Enden wurden anschließend durch T4 DNA Polymerase entfernt. Die zwei Ansätze dienten dazu, die entstandene DNA in der ersten bzw. zweiten Reaktion mit radioaktivem dCTP ($\alpha^{32}\text{P}$) zu markieren, um die Ausbeute berechnen zu können. Für das weitere Vorgehen wurden die Ansätze vereint.

Um die Ligationseffizienz der entstandenen „blunt end“ cDNA zu verbessern, wurden Adaptoren an die DNA angefügt. Hier verwendete Adaptoren sind kurze, doppelsträngige Oligomere, die am 3'-Ende blunt sind und am 5'-Ende einen Überhang von 4 Basen besitzen, in diesem Fall einer EcoR I-Schnittstelle entsprechend. Um das Gemisch von Proteinen zu reinigen, wurde es nach der Adaptor-Ligation mit Phenol-Chisam ausgeschüttelt und die cDNA gefällt. Um eine gerichtete Klonierung in den Hefvektor pJG4-5 zu ermöglichen, wurden die cDNA Stücke, die jetzt auf beiden Seiten einen EcoR I-Überhang besaßen, mit Xho I verdaut. Daraufhin wurde die cDNA auf einem 1% low melting Agarosegel (SeaPlaque, BMA) durch Elektrophorese aufgetrennt. Fragmente größer als 1000bp wurden ausgeschnitten und durch Verdau der Agarose mit Gelase (Biozym Diagnostik GmbH) freigesetzt. Anschließend wurde durch Messung der Radioaktivität wieder die Ausbeute

bestimmt. Die cDNA-Fragmente wurden dann in den mit EcoR I und Xho I verdauten und mit CIP behandelten Vektor pJG4-5 ligiert. Mehrere Ligationsreaktionen wurden parallel in elektrokompetente Zellen des Stammes *E. coli* XL1 Blue mit einem Puls von 2,5kV und 25µF transformiert. Aus einem Aliquot des Elektroporationsansatzes wurde jeweils die Transformationseffizienz bestimmt (5µl Zellsuspension mit 500µl LB-Medium mischen, 2 Platten mit 50µl und 150µl plattieren, Rest verwerfen), der restliche Ansatz wurde als Glycerolstock bei -80°C gelagert (500µl Zellsuspension gemischt mit 200µl Glycerol und 300 µl LB-Medium). Nach mehreren Ligationsreaktionen waren theoretisch genügend unabhängige Klone repräsentiert, um die Plasmide mittels Maxipräp zu vermehren und zu isolieren. Hierfür wurden die Glycerolstocks auf Eis aufgetaut und in 250ml LB-Medium überimpft. Nach einer Inkubationszeit von 15min bei 37°C und 225rpm wurden dem Medium 600µl Ampicillin zugesetzt, und die Kultur über Nacht bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Als die OD_{600nm} der Kultur zwischen 0,8 und 1,0 lag, wurden die Zellen geerntet und wie oben beschrieben weiterbehandelt (2.3.2).

2.11 Zwei-Hybrid-System

Das Zwei-Hybrid-System ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen in Hefen. Es eignet sich sowohl zur Identifizierung von neuen Interaktionspartnern eines bekannten Proteins unter Verwendung einer cDNA-Bibliothek als auch zur Untersuchung, ob zwei bestimmte Proteine miteinander interagieren (Ausubel *et al.*, 1995; Chien *et al.*, 1991; Gyuris *et al.*, 1993). Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, daß Transkriptionsaktivatoren und -inhibitoren aus zwei Domänen aufgebaut sind, nämlich einer DNA-Bindungsdomäne und einer Aktivierungs-/Inhibitionsdomäne. So ist es möglich, einen funktionellen Transkriptionsfaktor zu erhalten, der durch die Fusion einer Bindungsdomäne LexA (DNA-bindendes Protein, bindet spezifisch an LexA-Operatoren) mit einer Aktivierungsdomäne GAL4 (Transkriptionsaktivator) entsteht (Brent und Ptashne, 1985). Dadurch werden Gene exprimiert, deren Promotor von LexA-Operatoren kontrolliert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Interaktionspartner des mHCN2 C-Terminus identifiziert werden (Identifikation neuer Interaktionspartner). Ein Köderprotein („bait“; mHCN2-C) wird als Fusionsprotein mit LexA durch das Plasmid pEG202 exprimiert, wodurch es an Reportergene „fixiert“ wird, da LexA an deren Operatoren bindet. Bei den Reportergenen handelt es sich um *lacZ*, das durch die Transformation des Plasmids pSH18-34 in Hefen eingeschleust wird, und um *Leu2*, das im Genom des verwendeten Hefestamms (*S. cerevisiae* EGY48) vorliegt. Beide Gene werden von 8 bzw. 6 LexA-Operatoren kontrolliert und sind unter normalen Umständen inaktiv. Als drittes Plasmid wird pJG4-5 in EGY48 transformiert. Dadurch kommt es ebenfalls zur Expression eines Fusionsproteins, das aus einem „Beuteprotein“ („prey“, cDNA-Bibliothek aus *M. musculus* Herz) und dem transkriptionsaktivierenden „acid loop“ Protein (besitzt eine Reihe saurer Aminosäuren) besteht. Dieses Fusionsprotein steht unter der Kontrolle eines GAL1-Promotors und wird daher nur in Gegenwart von Galaktose als Kohlenstoffquelle exprimiert. Auf diese Weise kann der

Zeitpunkt der Expression durch Zugabe von Galaktose ins Medium bestimmt werden. Kommt es nun zu einer Interaktion zwischen mHCN2-C und einem Protein der Bibliothek, wird die Transkription der unter den LexA-Operatoren stehenden Gene (Reportergene) durch den „acid loop“ aktiviert; es liegt ein funktioneller Transkriptionsfaktor vor. Somit können die Hefezellen Leucin selbst synthetisieren und auf Leucin-defizienten Medien überleben. Durch die Aktivierung des *lacZ* Gens bilden diese Hefen zusätzlich β -Galaktosidase. Dieses Enzym ist in der Lage, chromogenes Substrat (X-Gal) umzusetzen, was durch Blaufärbung der Hefen sichtbar wird.

2.11.1 Verwendeter Stamm

Organismus	Relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EGY 48	<i>MATαtrp1 his3 ura3 6LexA-operator-LEU2</i>	Brent Laboratory, Clontech *

* Brent Laboratory, Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston

2.11.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Selektionsmarker	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pEG202	<i>HIS3</i> , Amp ^R	ADHpro-LexA-MCS	Expression der Köderproteine	Brent Laboratory, Clontech *
pJG4-5	<i>TRP1</i> , Amp ^R	GAL1pro-Aktivierungsdomäne der Transkription, HA-Tag	Expression der Beuteproteine	Brent Laboratory, Clontech *
pSH18-34	<i>URA3</i> , Amp ^R	8 LexAOperatoren- <i>lacZ</i>	Reporterplasmid, Indikator der Transkriptionsaktivierung	Brent Laboratory, Clontech *
pSH17-4	<i>HIS3</i> , Amp ^R	ADHpro-LexA-GAL4 Aktivierungsdomäne	Positivkontrolle für die Aktivierung der Transkription	Brent Laboratory, Clontech *
pRFHM1	<i>HIS3</i> , Amp ^R	ADHpro-LexA-Bicoid Domäne	Negativkontrolle für die Aktivierung der Transkription	Brent Laboratory, Clontech *
pJK101	<i>URA3</i> , Amp ^R	GAL1pro-LexA Operator- <i>lacZ</i>	Bestätigung der Bindung des Köderproteins an den LexA-Operator	Brent Laboratory, Clontech *

* Brent Laboratory, Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston

2.11.3 Verwendete Medien

YPD Medium

Hefe-Extrakt	10g
Peptone	20g
MQ	ad 900ml
20% Glukose-Lsg (Dextrose)	100ml

YPAD Medium

Hefe-Extrakt	10g
Peptone	20g
Adenin (hemisulfate salt, Sigma)	30mg
MQ	ad 900ml
20% Glukose-Lsg	100ml

DO Medium mit Glukose

Yeast Nitrogen Base-AA	1,7g
DO Supplement	xg
MQ	ad 900ml
20% Glukose-Lsg	100ml

DO Medium mit Galaktose/Raffinose

Yeast Nitrogen Base-AA	1,7g
DO Supplement	xg
MQ	ad 800ml
20% Galaktose-Lsg	100ml
10% Raffinose-Lsg	100ml

DO Supplement

xg

DO -Ura	0,77g
DO -His	0,77g
DO -Leu	0,69g

DO – Ura, -His	0,75g
DO –Ura, -His, -Leu	0,65g
DO –Ura, -Trp	0,72g

Medien für die 4 Bedingungen:

Galaktose/Raff DO/X-Gal –Ura, –His, –Trp

YNB	1,7g
DO –Ura, -His, -Trp	0,7g
MQ	ad 700ml
20% Galaktose-Lsg	100ml
10% Raffinose-Lsg	100ml
X-Gal (20mg/ml)	2ml
0,7M KPO ₄ -Puffer, pH7,0	100ml

Glukose DO/X-Gal –Ura, –His, –Trp

YNB	1,7g
DO –Ura, -His, -Trp	0,7g
MQ	ad 800ml
20% Glukose-Lsg	100ml
X-Gal (20mg/ml)	2ml
0,7M KPO ₄ -Puffer, pH7,0	100ml

Galaktose/Raff DO/ –Ura, –His, –Trp, –Leu

YNB	1,7g
DO –Ura, -His, -Trp, -Leu	0,6g
MQ	ad 800ml
20% Galaktose-Lsg	100ml
10% Raffinose-Lsg	100ml

Glukose DO/ –Ura, –His, –Trp, –Leu

YNB	1,7g
DO –Ura, -His, -Trp, -Leu	0,6g
MQ	ad 900ml
20% Glukose-Lsg	100ml

Für die Herstellung der Hefe-Medien wurden Hefe-Extrakt, Pepton, Yeast Nitrogen Base (Stickstoffquelle ohne Aminosäuren), Agar und die Zucker (Dextrose, Galaktose, Raffinose) von Difco bezogen. Die verschiedenen „Drop out Supplements“ (Medien-Zusatz aus Aminosäuren, dem einzelne oder kombinierte fehlen) wurden bei Clontech bestellt.

Um ein Karamelisieren der Zucker zu vermeiden, wurden die Zuckerlösungen getrennt autoklaviert und bei 4°C gelagert. Nach dem Autoklavieren des restlichen Mediums wurde die Zuckerlösung steril zugegeben.

Für die Herstellung von Agarplatten wurden dem jeweiligen Medium vor dem Autoklavieren 20g Agar und pro Liter ein NaOH-Plätzchen (Roth), um den sauren pH des Agars auszugleichen, zugegeben. Nachdem die Zuckerlösungen dem Medium steril hinzugefügt worden waren, wurde das Medium in sterile Petrischalen gegossen.

2.11.4 Verwendete Lösungen

X-Gal

x-Gal	20mg
100% N,N-dimethylformamid	1ml

Z-Puffer

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	60mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	40mM
KCl	10mM
MgSO_4	1mM

Glycerol-Lösung

Glycerol	65% w/v
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	100mM
Tris/HCl, pH8,0	25mM

β -Mercaptoethanol	50mM
pH7,0	

TE-Puffer

SS-DNA

high molecular weight DNA, sodium salt type III from Salmon Testes (Sigma)	200mg
TE-Puffer	ad 100ml

Tris-HCl, pH8,0	10mM
EDTA	1mM

50% PEG

PEG, MW 3350	50% w/v
--------------	---------

0,7M Kaliumphosphat-Puffer pH7

1M K_2HPO_4 -Lsg	430,5ml
1M KH_2PO_4 -Lsg	269,5ml
MQ	300ml

Besonderheiten einiger Lösungen:

X-Gal: Lagerung bei -20°C

Z-Puffer: Der Z-Puffer darf nicht autoklaviert werden und wird bei RT gelagert.

Glycerol-Lösung: Die Lösungen werden getrennt hergestellt und autoklaviert, anschließend steril vereinigt und bei RT gelagert.

SS-DNA: Von der SS-DNA kann man einen größeren Ansatz machen und bei -20°C lagern. Vor dem Gebrauch sollten kleinere Aliquots hergestellt werden, die für 5min bei 95°C in Einzelstränge überführt werden und auch bei -20°C gelagert werden. Ein einmal aufgekochtes Aliquot kann man bis zu 4 mal verwenden.

2.11.5 Kultivierung

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte aerob in verschiedenen Medien (YPD, YPAD oder entsprechende Drop out-Medien). Flüssigkulturen wurden in Glasröhrchen oder Erlenmeyerkolben bei 30°C und 225rpm geschüttelt. Zur kurzfristigen Aufbewahrung und um Einzelkolonien zu erhalten, wurden Hefe-Suspensionen auf Agarplatten mit entsprechender Selektion ausgestrichen bzw. plattiert und für ein bis drei Tage bei 30°C inkubiert. Die Platten konnten bis zu 8 Wochen bei 4°C gelagert werden. Zur längeren Aufbewahrung wurden von einer üN-Kultur 5ml abzentrifugiert, die Zellen in 750µl Medium resuspendiert und mit 1Vol Glycerol-Lösung gemischt. Diese Glycerolstocks wurden bei -80°C gelagert.

2.11.6 Konstruktion des „Baits“

Als Köderprotein („bait“) für den Zwei Hybrid-Versuch wurde die entsprechende DNA in den Vektor pEG202 kloniert. Nach der Transformation in die Hefe ergibt sich ein Fusionsprotein, das aus einem lexA-Anteil am N-Terminus und dem zu untersuchenden Protein am C-Terminus besteht.

2.11.7 Vorversuche mit dem Bait

Nach der Konstruktion des Köders wurde eine Basischarakterisierung durchgeführt: Ein „bait“ ist für den Einsatz im Zwei-Hybrid System nur dann geeignet, wenn es bestimmte Bedingungen erfüllt. Es darf keine unspezifische oder vorzeitige Transkriptionsaktivierung auslösen, es muß in den Zellkern gelangen und an die LexA-Operatoren binden, und es muß eine Proteinexpression des LexA-Fusionsproteins nachweisbar sein. Dazu wurden drei Versuche nach Ausubel *et al.* (1995) durchgeführt.

2.11.7.1 Activation Assay

Um zu untersuchen, ob das Bait an die LexA-Operatoren bindet und so die Trankription von LacZ aktiviert, wurden verschiedene Plasmid-Kombinationen in WT Hefezellen transformiert (2.11.8.1). Das zu untersuchende Plasmid mit dem Köder wurde mit pSH18-34 transformiert, als Positiv-Kontrolle dienten die Plasmide pSH17-34 + pSH18-34, als Negativ-Kontrolle wurden die Plasmide pRFMH1 + pSH18-34 verwendet (siehe 2.11.2). Nach zwei bis vier Tagen wurden von den Glu –Ura –His Platten Klone auf eine Masterplatte gepickt. Diese Klone wurden, nachdem sie ausreichend gewachsen waren, mit einem Filterpapier (3mm), das auf die Größe der Petrischale zugeschnitten war, abgenommen. Zur Lyse der Zellen wurde der Filter mit den Hefezellen auf der Oberseite drei mal jeweils für 10min bei -80°C inkubiert, dann für 5min bei RT wieder aufgetaut. Anschließend wurde er auf einen Filter gelegt, der mit Puffer Z und 1mg/ml X-Gal getränkt war. Das X-Gal im Z-Puffer wird von dem Hefetragenden Filter aufgesaugt, und die durch Lyse der Zellen zugängliche β -Galactosidase führt beim Testansatz sowie bei der Positiv-Kontrolle zu einer Blaufärbung. Die Filter wurden bei 30°C inkubiert und alle 15min betrachtet. (Starke Aktivatoren bilden schon nach 5–10min eine blaue Farbe, während schwache Aktivatoren bis zu 6h benötigen, bis sie eine Blaufärbung aufweisen.)

2.11.7.2 Repression Assay

Um zu testen, ob das LexA-Fusionsprotein in den Hefezellen exprimiert wird und kerngängig ist, wurden wieder drei Ansätze mit verschiedenen Plasmiden transformiert (2.11.8.1). Das Bait wurde mit pJK101 transformiert, als Positiv-Kontrolle dienten die Plasmide pRFHM1 + pJK101, als Negativ-Kontrolle wurde das Plasmid pJK101 alleine verwendet. Nach zwei bis vier Tagen wurden von den Glu –Ura –His (Test und Positiv-Kontrolle) bzw. Glu –Ura Platten (Negativ-Kontrolle) Klone auf eine Masterplatte gepickt. Weitere zwei Tage später wurden die gepickten Klone auf Drop out-Platten übertragen, in denen Galaktose als einzige Kohlenstoff-Quelle vorhanden war, um die Transkription von LacZ auf dem Plasmid pJK101 zu aktivieren. Das weitere Vorgehen gleicht dem Vorgang beim Activation Assay. Die Hefen werden auf Filter übertragen, die mit Puffer Z und X-Gal inkubiert werden (2.11.7.1). Das Ergebnis sollte so aussehen, daß sowohl der Test-Ansatz als auch die Positiv-Kontrolle weiß bleiben, da hier durch eine Bindung des LexA-Fusionsproteins an die LexA-Operatoren des pJK101 im Zellkern die Expression des dahinterliegenden *LacZ*-Gens unterdrückt wird.

2.11.7.3 Leu Requirement

Um zu untersuchen, ob das Bait die Expression des genomischen *Leu2*-Gens unspezifisch aktiviert, wurden Hefezellen von der Transformation für den Activation Assay mit dem Bait-Plasmid und pSH18-34 verwendet (2.11.7.1). Ein Klon dieser Zellen wurde in 500µl MQ suspendiert. Aus der Suspension wurde eine Verdünnungsreihe bis 1:1000 hergestellt, je 100µl auf Glu –Ura –His und auf Glu –Ura –His –Leu-Platten plattiert und bei 30°C inkubiert. Auf den Glu –Ura –His-Platten sollten entsprechend der Verdünnungsreihe Klone wachsen, während die Glu –Ura –His –Leu-Platten leer bleiben sollten.

2.11.8 Transformation von EGY 48 Hefezellen

Die Transformation wurde mit Hilfe der Lithiumazetat Methode nach unterschiedlichen Protokollen durchgeführt. Durch die Anwesenheit alkalischer Kationen wird die Fremd-DNA von den Zellen leichter aufgenommen, die Zugabe einer Träger-DNA erleichtert das Einschleusen der Plasmide zusätzlich. Im Rahmen dieser Arbeit war es notwendig, zwei bis drei verschiedene Plasmide in jede Zelle zu transformieren. Dabei darf es nicht zum Ausschleusen der Plasmide kommen. Das Vorhandensein der Plasmide erlaubt den Hefen die Synthese verschiedener Aminosäuren bzw. von Uracil, was zur Selektion von erfolgreich transformierten Hefen ausgenutzt werden kann, indem diese auf den entsprechenden Mangelmedien gehalten werden.

2.11.8.1 Quick and Easy TRAF0 Protokoll für die Vorversuche

Für die Vorversuche und vor der Bibliothekstransformation wurden jeweils 2 Plasmide gleichzeitig transformiert (nach Gietz und Woods, 2002).

Dafür wurden Hefezellen (für jede geplante Transformation ca. ein Volumen von 25µl) mit einem sterilen Zahnstocher von einer frisch ausgestrichenen Platte mit WT Hefe abgenommen

und in 1ml MQ resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Zentrifuge für 5sec bei maximaler Umdrehungszahl pelletiert, der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 1ml 100mM LiAc aufgenommen und für 5min bei 30°C im Heizblock inkubiert. Danach wurde das Zellvolumen, das für jeweils eine einzelne Transformation benötigt wurde, in ein neues steriles cap pipettiert und die Zellen wie oben abzentrifugiert. Folgende Lösungen wurden nun in der angegebenen Reihenfolge auf das Zellpellet pipettiert:

240µl 50% PEG
36µl 1M LiAc
50µl SS-DNA (2mg/ml)
25µl MQ – xµl DNA
xµl DNA (ca. 1µg pro Ansatz)

(Man kann auch aus dem PEG, dem LiAc und der SS-DNA einen Mastermix für alle Transformationsreaktionen machen, die Hefezellen in 326µl davon resuspendieren und dann zu jedem Ansatz einzeln die 25µl MQ + DNA zupipettieren. Indem man die DNA später getrennt zugibt, geht sie nicht beim Transfer des zähen Mastermixes auf die Zellen verloren.)

Der Transformationsansatz wurde gut gemischt, bis die Zellen gelöst waren, was bis zu einer Minute dauern kann, und dann für 20min bei 42°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10sec pelletiert, der Transformationsmix mit einer Pipette vorsichtig entfernt und das Pellet durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in 200µl MQ resuspendiert. Zum Schluß wurden die Zellen auf entsprechendem Drop out-Medium, das für die transformierten Plasmide selektiert, ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Klone waren nach 2–4 Tagen zu sehen.

2.11.8.2 Two Hybrid System TRAF0 Protokoll für die Bibliothekstransformation

Diese Methode nach Agatep *et al.* (1998) wurde für die Transformation der Bibliotheksplasmide in EGY 48 Hefen, die schon das Bait- und das Reporterplasmid enthalten, verwendet. Es wurde mit einem 20fachen Ansatz gearbeitet.

Hefetransformanten, die bereits die entsprechenden zwei Plasmide beinhalten (deren Transformation nicht länger als eine Woche zurückliegen sollte), wurden über Nacht bei 30°C in 5, 7 und 10ml (Röhre 13ml, Sarstedt) des entsprechenden Drop-out Mediums bei 225rpm geschüttelt (Certomat IS, B. Braun, biotech international).

Am nächsten Morgen wurde die OD bei 600 nm gemessen (Spectronic 20 Genesys) und errechnet, in welchem Volumen sich 5×10^8 Zellen befinden ($OD_{600nm} = 1$ entspricht 2×10^7 Zellen/ml). Die Zellen wurden aus dem errechneten Volumen abzentrifugiert (3000xg für 5min). Das Zellpellet wurde in vorgewärmtem YPAD Medium resuspendiert und in insgesamt 50ml Medium im autoklavierten 250ml-Erlenmeyerkolben bei 30°C und 200rpm(!) geschüttelt, bis die Zelldichte 2×10^7 Zellen/ml betrug (ca. 3-4h). Die Zellen wurden dann in zwei 50ml-Röhrchen (Sarstedt) umgefüllt und durch Zentrifugation für 5min bei 3000xg geerntet. Der Überstand wurde zügig abgegossen, so daß keine Zellen verloren gingen.

Anschließend wurden die Zellpellets in je 25ml MQ gewaschen und wie oben zentrifugiert. Jedes Pellet wurde daraufhin in 1,5ml 100mM LiAc gelöst, die beiden Lösungen in einem der 50ml Röhrchen vereint und für 15min bei 30°C in einem Wasserbad (Haake P14 mit Haake DC10) inkubiert, dann abzentrifugiert. Folgende Lösungen wurden nun in der angegebenen Reihenfolge auf das Zellpellet pipettiert:

4,8ml 50% PEG
720µl 1M LiAc
1ml SS-DNA (2mg/ml)
680µl MQ – xµl DNA
xµl DNA (ca. 1µg pro Ansatz)

Der Transformationsansatz wurde gut gemischt, bis die Zellen gelöst waren und für 30min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Es folgte der Hitzeschock, bei dem die Zellen für weitere 30min bei 42°C in einem zweiten vorgeheizten Wasserbad inkubiert wurden, wobei durch einmaliges Wenden des Röhrchens alle 5min eine gleichmäßige Wärmeverteilung gewährleistet wurde. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation wie oben geerntet, in 8ml MQ aufgenommen und unter einer „laminar air flow“ je 200µl auf 40 große Platten (150x20mm, ohne Nocken, Sarstedt) mit entsprechendem Drop out-Medium (hier: Glu –Ura –His –Trp) ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert, nach 2–10 Tagen waren Klone sichtbar.

Titer-Check:

Von den 8ml Zellsuspension wurden 1:100, 1:1000 und 1:10000 Verdünnungen hergestellt und pro Verdünnungsstufe je 100µl auf 2 Platten (Glu –Ura –His –Trp) ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert und nach ca. zwei Tagen ausgezählt, um auf die Transformationseffizienz schließen zu können.

2.11.8.3 High Efficiency TRAF0 Protokoll für den “Rescreen”

Diese Methode nach Gietz und Woods (2002) wurde für die Transformation von 3 Plasmiden gleichzeitig angewandt, wie es z.B. für den Rescreen nötig ist.

WT Hefezellen wurden in 2–5ml flüssigem YPAD Medium angeimpft und über Nacht bei 225rpm und 30°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Zelldichte der üN-Kultur ermittelt ($OD_{600nm} = 1$ entspricht 2×10^7 Zellen/ml) und 50ml vorgewärmtes YPAD Medium mit $2,5 \times 10^8$ Zellen angeimpft (entspricht 5×10^6 Zellen/ml). Die 50ml-Kultur wurde bei 30°C und 200rpm so lange geschüttelt, bis eine Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml erreicht war (ca. 3–5h). Diese Kultur enthält genug Zellen für 10 Transformationen!

Die Zellen wurden in einem sterilen 50ml Röhrchen für 5min bei 3000xg abzentrifugiert und der Überstand wurde zügig abgegossen, so daß keine Zellen abgeschüttet wurden. Das Zellpellet wurde mit 25ml MQ gewaschen, abzentrifugiert und anschließend in so viel 100mM LiAc resuspendiert, daß das gesamte Volumen 1ml betrug. Davon wurden je 100µl in

10 sterile 1,5ml caps überführt, die Zellen abzentrifugiert und das LiAc entfernt. Folgende Lösungen wurden nun in der angegebenen Reihenfolge auf das Zellpellet pipettiert:

240µl	50% PEG
36µl	1M LiAc
50µl	SS-DNA (2mg/ml)
34µl	MQ – xµl DNA
xµl	DNA (ca. 1µg pro Ansatz)

Der Transformationsansatz wurde gut gemischt, bis die Zellen gelöst waren und für 30min bei 30°C im Heizblock inkubiert. Es folgte der Hitzeschock, bei dem die Zellen für weitere 30min bei 42°C im Heizblock inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, der Transformationsmix mit einer Pipette vorsichtig entfernt und das Pellet durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in 200µl MQ resuspendiert. Die 200µl Zellsuspension wurden auf Platten mit entsprechendem Drop out-Medium plattiert, und 2–4 Tage bei 30°C inkubiert.

2.11.9 Ernte der bibliotheks-transformierten Hefezellen

Nachdem die cDNA-Bibliothek in die Hefen eingeschleust worden war (2.11.8.2), dauerte es zwischen zwei und vier Tagen, bis alle Platten ungefähr gleichmäßig bewachsen waren. Zur Ernte der Hefezellen wurden auf jede Platte 8ml Flüssigmedium Glu –Ura –His –Trp pipettiert, und die Platten auf einem Horizontal-Schüttler für 1h bei 100rpm und RT geschwenkt. Dadurch lösten sich die Hefekolonien und konnten später mit dem Medium von den Platten abgenommen werden. Nicht gelöste Kolonien wurden bei Abnahme der Suspension (meist waren nur noch ca. 5ml auf der Platte) aus schräg gestellten Platten mit der Pipette abgespült und jede Platte 2x mit je 2ml Medium nachgespült. Die Zellsuspension wurde in 50ml Röhrchen (Sarstedt) gesammelt, und die Zellen für 7min bei 3000xg abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen mindestens zweimal mit 1Vol MQ gewaschen und vereinigt, bis sich alle Zellen in einem 50ml Röhrchen befanden. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurden die Zellen in 1Vol Glycerol-Lösung (2.11.4) resuspendiert, zu je 1ml in 2ml caps aliquotiert und bei –80°C gelagert.

2.11.10 „Replating Efficiency“

Um zu überprüfen, wie viele Zellen aus einem definierten Volumen der Glycerolstocks wieder anwachsen, wurde die sogenannte Replating Efficiency bestimmt. Zu diesem Zweck wird ein Aliquot eines Glycerolstocks 1:10 mit Gal/Raff –Ura –His –Trp verdünnt und für 4h bei 30°C geschüttelt, um den GAL1-Promotor zu induzieren. Raffinose-Zugabe beschleunigt das Wachstum, ohne die Transkription vom GAL1-Promotor zu verringern. Nach den 4h wurde eine Verdünnungsreihe (1:100 bis 1:10000) von der Zellkultur hergestellt und pro Verdünnungsstufe je 100µl auf zwei Gal/Raff –Ura –His –Trp-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C mehrere Tage inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden. Meist waren die einzelnen Kolonien erst ab der 1:1000 Verdünnung zu zählen. Aus den gezählten Kolonien

konnte die Anzahl der „cfu“ (colony forming units) pro Aliquot transformierter Hefe berechnet werden.

2.11.11 Detektion positiver Klone

Für die Suche nach Interaktoren wurde bezugnehmend auf die „replating efficiency“ berechnet, wie viel eines Glycerolstocks 1:10 verdünnt und 4h inkubiert werden muß, damit sich eine Zellzahl ergibt, die ausreichend ist, um 10^6 Zellen pro Platte auf 20 Platten zu plattieren. Die geschüttelten Zellen wurden abzentrifugiert, in 2ml Gal/Raff –Ura –His –Trp –Leu resuspendiert und je 100µl auf 20 Gal/Raff –Ura –His –Trp –Leu-Platten plattiert. Durch das fehlende Leucin im Medium sind nur Zellen fähig zu wachsen, in denen durch eine Interaktion von Köder und Beute DNA-Bindungsdomäne und Transkriptionsaktivator in räumliche Nähe gebracht wurden und das genomische *Leu2*-Gen abgeschrieben wird. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert. An Tag 2, Tag 3 und Tag 4 nach dem Ausplattieren wurden die jeweils neu auf einer Platte gewachsenen Klone gepickt und auf Masterplatten (Gal/Raff –Ura –His –Trp –Leu) ausgestrichen. Da es bei diesem System eine große Zahl an falsch-positiven Ergebnissen geben kann, werden die Klone auf ihre Galaktose-Abhängigkeit getestet.

Dies geschieht durch Ausstreichen auf Platten mit vier verschiedenen Bedingungen, auf denen Hefezellen, deren Plasmide für interagierende Proteine codieren, sich folgendermaßen verhalten:

Bedingung auf der Platte	Reaktion der Hefe
Gal/Raff X-Gal –Ura –His –Trp	Blaufärbung
Glu X-Gal –Ura –His –Trp	keine Blaufärbung
Gal/Raff –Ura –His –Trp –Leu	Wachstum
Glu –Ura –His –Trp –Leu	kein Wachstum

Das Verhalten der Hefezellen ergibt sich daraus, daß eine Blaufärbung nur dann auftreten kann, wenn Galaktose im Medium ist, da das *LacZ*-Gen auf dem Reporterplasmid pSH18-34 unter Kontrolle des GAL1-Promotors steht. Hefen, die sich auf Glukose/X-Gal-Platten blau färben, sind ein Hinweis auf eine unspezifische Aktivierung des *LacZ*-Gens. Ebenso darf eine zum Wachstum auf Leu-defizientem Medium befähigende Interaktion nur auf Galaktose enthaltenden Platten auftreten, da auch das Insert des Bibliotheksplasmids pJG4-5 unter der Kontrolle des GAL1-Promotors steht. Sind die Hefen zum Wachstum auf Glukose enthaltenden Platten fähig, besteht keine spezifische Interaktion.

2.11.12 Bestätigung der Interaktionen

Um zu prüfen, ob sich die Interaktion in den Hefen reproduzieren läßt, wurde der sogenannte „rescreen“ durchgeführt. Hierfür wurde aus den Hefezellen der positiven Interaktoren direkt eine PCR (2.7) durchgeführt.

Lösung I

Primer TH5 (25pmol/μl)	1μl
Primer TH7 (25pmol/μl)	1μl
dNTPs (je 1,25mmol/μl) (Roth)	5μl
10xTaq-Puffer	9μl

Lösung II

Taq	0,5μl
10xTaq-Puffer	1μl
MQ	8,5μl

Mit einem Zahnstocher wurden von einer Kolonie auf der Platte Zellen in ein 0,5ml cap übertragen, in 74μl MQ suspendiert und 5min bei 99°C aufgeköcht, um die Zellen zu lysieren. Die Temperatur wurde bei 80°C gehalten, bis 16μl der Lösung I zupipettiert waren. Für Lösung I und II wurde bei mehreren Ansätzen ein Master-Mix vorbereitet. Anschließend erfolgte für 5min bei 95°C die initiale Denaturierung, nach der das Enzym in 10μl Lösung II zugegeben wurde. Die aufeinanderfolgenden Zyklen setzten sich wie folgt zusammen und wurden 35 x wiederholt:

Denaturierung	95°C	1:00
Annealing	48°C	1:00
Elongation	72°C	2 :30

Die finale Elongation für 8min bei 72°C beendete das Programm. Um zu überprüfen, ob die PCR erfolgreich war, wurden vom PCR-Produkt 5μl mit Auftragspuffer auf ein Agarose-Gel aufgetragen. PCR-Produkte, die eine distinkte Bande zeigten, wurden über eine GFX-Säule (Amersham) aufgereinigt (2.6.4), mit EcoR I und Xho I verdaut (2.5.1) und auf ein präparatives Agarose-Gel aufgetragen. Die durch EtBr und UV-Licht sichtbar gemachte Bande wurde ausgeschnitten, und die DNA mit dem GFX-Kit (2.6.4) aus dem Gel eluiert. Die eluierte DNA wurde in den mit EcoR I und Xho I geschnittenen, mit CIP behandelten pJG4-5 Vektor ligiert (2.5.4), zur Vermehrung in Bakterien transformiert (2.9.3.1), durch Alkalische Lyse (2.3.1) kontrolliert und anschließend zusammen mit dem Bait und dem Reporterplasmid pSH18-34 in die Hefen retransformiert (2.11.8.3). Mittels der vier verschiedenen Bedingungen wurde getestet, ob eine Interaktion stattfindet.

2.12 Kultur eukaryotischer Zellen

2.12.1 Verwendete Zelllinie

Für die heterologe Expression verschiedener Proteine in eukaryotischen Zellen wurde die Zelllinie HEK293 (HEK) (ATCC®Nr.CRL 1573, Graham *et al.*, 1977) verwendet. Es handelt sich dabei um humane embryonale Nierenzellen (**human embryonic kidney cells**), die stabil mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transfiziert sind, wodurch ein permanentes Wachstum der Zellen ermöglicht wird.

2.12.2 Verwendetes Nährmedium

Minimum essential medium (MEM-Medium) (Gibco)

Für das Wachstum von Säugerzellen ist MEM-Medium besonders gut geeignet, da es Bestandteile wie Aminosäuren, Vitamine, Glukose und Mineralien enthält. So entsprechen die Kulturbedingungen so weit es geht den *in vivo* herrschenden Zuständen. Die Aminosäure L-Glutamin ist in einer stabilisierten Form als Dipeptid (Glutamax ITM, L-Alanyl-L-Glutamin) im MEM-Medium enthalten. Eine Lagerung bei +2°C bis +8°C wird empfohlen.

Da die HEK-Zellen in rein synthetischen Medien nicht überleben, wurde dem MEM-Medium vor dem Gebrauch FBS (Biochrom) zugegeben (50ml FBS auf 450ml MEM). Dadurch wurde die Versorgung der Zellen mit bestimmten Wachstumsfaktoren, Hormonen und Anheftungsfaktoren sichergestellt. Außerdem wurde dem Medium eine Mischung aus Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) (Biochrom) zugegeben, um das Wachstum von Bakterien zu verhindern.

2.12.3 Verwendete Lösungen

PBS pH7,4		0,05%Trypsin/0,02%EDTA	
NaCl (Roth)	40,0g	Stammlösung (Biochrom)	0,5% Trypsin
KCl (Roth)	1,0g		0,2% EDTA
Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	14,5g	verdünnt mit PBS	1:10
KH ₂ PO ₄ (Roth)	1,2g	Lagerung bei –20°C	
H ₂ O	ad 5000ml		

2.12.4 Kultivierung

HEK293 Zellen wachsen in Monolayern (adhärente Kultur) an den Wänden von Plastik-Kulturgefäßen aus Polystyrol (Sarstedt). Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C inkubiert. Eine CO₂-Konzentration von 6% diente der Konstanthaltung des pH-Werts im Medium. Die verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Alle drei Wochen wurde ein Gefrierstock aus –196°C auf Eis aufgetaut und in eine Kulturflasche mit vorgelegtem Medium ausgesät. Sobald die Flasche konfluent bewachsen war, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und Trypsin/EDTA zugegeben. Nach kurzer Einwirkzeit lösten sich die Zellen voneinander und von der Flaschenwand. Durch Zugabe von frischem Medium wurde das Trypsin inaktiviert (durch FBS) und die Zellen vereinzelt. Anschließend wurden sie entweder 1:10 verdünnt und in neue Flaschen ausgesät oder nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer für eine spätere Transfektion ausgesät.

2.12.5 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels Lipofektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Bei der transienten Transfektion wird die zirkuläre DNA unabhängig vom Genom der Wirtszelle (episomal) transkribiert, die eingeschleusten Gene sind allerdings nur vorübergehend aktiv und gehen im Verlauf weiterer Zellteilungen wieder verloren. Im Gegensatz hierzu gibt es die stabile Transfektion (Elektroporation), wobei das Fremdgen zufällig ins Genom der Wirtszelle integriert, dort mit diesem vermehrt und bei entsprechender Selektion an die Tochterzellen weitergegeben wird.

Fugene[®]6 Transfection Reagent (Roche) besteht aus Lipiden in nicht-liposomaler Form. Diese bilden mit Plasmid-DNA in serumfreier Lösung Komplexe, die durch Endocytose ins Zellinnere gelangen. Gegenüber anderen Methoden ist die Transfektionseffizienz wesentlich erhöht.

Die Transfektion wurde in 6-Lochplatten durchgeführt. Pro well wurden vormittags 700000 Zellen in die Platten ausgesät. Nach ungefähr 6h wurde der Transfektionsmix (119µl pro Loch einer 6-Lochplatte [9,5cm²]: 115µl serumfreies MEM wurde mit 3,6µl Fugene[®]6 (Roche) 5min bei RT inkubiert, danach 1,2µg DNA zupipettiert und der Ansatz 30min bei RT inkubiert) tropfenweise auf die Zellen pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden für 72h bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit wurde genug Protein exprimiert, um weitere Versuche damit durchzuführen.

2.13 Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt von HEK293-Zell- und Bakterienlysaten für den GST-Pulldown wurde gegebenenfalls mittels der Bradford-Methode bestimmt. Hierzu wurde eine BSA-Standardreihe von 1-30µg Protein ad 100µl 0,15M NaCl hergestellt. Zwei Minuten nach Zugabe von je 1ml Coomassie Brilliantblau G250 Lösung wurde die Absorption bei 595nm photometrisch (Eppendorf Bio Photometer) vermessen. Die Proteinproben wurden analog vermessen und vom Photometer anhand der Standardreihe quantifiziert.

Coomassie Brilliantblau G250 Lösung

Coomassie brilliant blue G250 (Merck)	50mg
95% EtOH	25ml
H ₃ PO ₄	50ml
MQ	ad 500ml

nach Filtrieren Lagerung bei 4°C

2.14 Western Blot Analyse

2.14.1 Verwendete Lösungen

5 x Elektrophoresepuffer

Tris	15,1g
Glycin (Roth)	72g
SDS (Roth)	5g
MQ	ad 1000ml
Lagerung bei 4°C	

6 x Probenpuffer (Laemmli)

Tris-Cl/SDS pH6,8	7ml
Glycerol (Merck)	3ml
SDS	1g
Bromphenolblau	1,2mg
DTT (Zusatz nur bei Ko-IP) (Roth)	0,93g
MQ	ad 10ml
Lagerung bei -20°C	

4 x Trenngelpuffer

Tris	1,5M
SDS	0,4%
pH8,8	

4 x Sammelgelpuffer

Tris	0,5M
SDS	0,4%
pH6,8	

6% Trenngel

Acrylamid für SDS-PAGE	3ml
4xTrenngelpuffer	3,75ml
MQ	8,25ml
20% APS	30µl
TEMED	10µl

10% Trenngel

Acrylamid für SDS-PAGE	5ml
4xTrenngelpuffer	3,75ml
MQ	6,25ml
20% APS	30µl
TEMED	10µl

Sammelgel

Acrylamid für SDS-PAGE	0,65ml
4xSammelgelpuffer	1,25ml
MQ	3,05ml
20% APS	25µl
TEMED	5µl

Acrylamid für SDS-PAGE (Roth)

Acrylamid	30%
N,N'-Methylen-bisacrylamid	0,8%

Fixierlösung

Isopropanol	25% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)
MQ	65%

Lagerung bei RT

Coomassie-Lösung

Coomassie brilliant blue R-250	0,006% (w/v)
Eisessig	10%
MQ	90%

Transferpuffer

Tris	3,03g
Glycin	14,4g
Methanol (Roth)	200ml
H ₂ O	ad 1000ml

10 x TBS, pH8,0

Tris	12,1g
NaCl	80,23g
H ₂ O	ad 1000ml

Ponceau-S-Lösung 0,5%

Ponceau S (Sigma)	0,5g
Eisessig (Roth)	1ml
H ₂ O	ad 100ml

1 x TBST**1 x TBS**

Tween20 (Roth)	0,1%
----------------	------

Blockierungslösung**1 x TBST**

BSA	5%
-----	----

2.14.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE). Durch die Anlagerung von SDS an Proteine werden übergeordnete Raumstrukturen aufgelöst und unlösliche Proteinaggregate (z.B. Einschlußkörper) solubilisiert. Durch die Zugabe von SDS (Anion) werden die proteineigenen Ladungen überlagert, was zu einem größenabhängigen Wanderverhalten der Moleküle im Gel führt. Eine Trennung aller Disulfidbrücken kann durch die Zugabe von reduzierenden Agentien wie DTT erreicht werden. Um die Größe der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können, wurde auf jedes Gel ein Größenstandard (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen) aufgetragen. Die Prozentigkeit der Gele variierte je nach Größe der zu analysierenden Proteine. Für den Nachweis von mHCN1 und mHCN2 wurden 6%ige Gele, für die GST-Konstrukte 10%ige Gele und für die myc-Konstrukte 15%ige Gele verwendet.

Die Elektrophorese wurde in einer Mini-Gel Apparatur der Fa. Biorad (Protean 3) durchgeführt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine unspezifisch mit Coomassie (2.14.3) angefärbt oder spezifisch durch Immunoblot (2.14.4) nachgewiesen.

Zur Herstellung der Gele wurden Glasplatten mit 0,75mm oder 1,5mm Platzhaltern in eine Giessvorrichtung gesetzt, das Trenngel bis 2cm unter den oberen Rand gegossen und mit

Isopropanol überschichtet. Nach 1h wurde das Isopropanol entfernt, mit 4xTrenngelpuffer gewaschen und das Sammelgel eingefüllt, in das ein Kamm mit 10 Taschen gesteckt wurde.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 6xLämmli versetzt, für 5min bei 98°C im Wasserbad denaturiert und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese in 1xElektrophoresepuffer dauerte bei 100V (max. 30mA) ca. 2h.

2.14.3 Coomassie-Färbung

Der Farbstoff Coomassie-Blau kann Proteine unspezifisch binden und im Gel sichtbar machen. Da die Bindung des Triphenylmethanfarbstoffes proportional zur Proteinmenge erfolgt, ist eine quantitative Auswertung möglich. Mit Coomassie Blau können Proteinbanden ab 50ng detektiert werden.

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde vorsichtig von den Spacerplatten gelöst, in eine Glasschale gelegt und mit ca. 3 Gelvolumen Fixierlösung bedeckt. Nachdem das Gel 30min bei RT in der Fixierlösung inkubiert worden war, wurde diese abgegossen und das Gel mit Coomassie-Lösung bedeckt, in der es 1-3h bei RT schüttelte. Nachdem die Färbelösung abgegossen worden war, wurde das Gel zur Entfärbung eine weitere Stunde in 10%iger Essigsäure geschüttelt. Dabei bleibt die Bindung des Farbstoffes an die Proteine erhalten, während der übrige Farbstoff aus dem Gel gewaschen wird. Das gefärbte Gel wurde dann auf eine Glasplatte gelegt, die obere Seite mit Frischhaltefolie abgedeckt und mittels eines Scanners dokumentiert.

2.14.4 Immunologische Detektion durch Western Blot

Die Gegenwart verschiedener Proteine in den Proteinlysaten sollte durch Western Blot spezifisch nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden die aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran, Schleicher&Schüll) transferiert.

Heterolog exprimierte Proteine konnten nun durch die Verwendung spezifischer Antikörper oder Antiseren auf der Membran markiert und mit Hilfe einer sensitiven Chemolumineszenz-Methode (ECL, Amersham) sichtbar gemacht werden. Dabei bindet ein sekundärer, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper (Amersham) an den membrangebundenen primären, proteinspezifischen Antikörper. Die Peroxidase oxidiert Luminol, wodurch ein lichtemittierender, angeregter Übergangszustand eintritt. Die Chemolumineszenz lässt sich mit einem Film (Hyperfilm ECL, Amersham) dokumentieren.

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine vom SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran wurden folgende Schichten luftblasenfrei aufeinandergelegt (Angaben beziehen sich auf die Reihenfolge von der Kathode zur Anode):

Schwamm, äquilibriert in Transferpuffer

Whatman Filter 3 MM, äquilibriert in Transferpuffer

SDS-Gel

Nitrocellulosemembran, äquilibriert in Transferpuffer

Whatman Filter 3 MM, äquibriert in Transferpuffer

Schwamm, äquibriert in Transferpuffer

Dieser „Sandwich“ wurde senkrecht in die mit Transferpuffer gefüllte Blottingapparatur (Mini Trans Blot[®], Biorad) gestellt und für 1h bei 100V geblottet. Zur Visualisierung des Markers und zur ersten Einschätzung des Proteingehaltes der Proben wurde die Membran für 5min in Ponceau S-Lösung geschüttelt und nach partieller Entfärbung mit MQ der Größenstandard mit Bleistift markiert. Anschließend wurde die Membran in 1xTBST gewaschen und über Nacht bei 4°C in Blockierlösung inkubiert, um freie Protein-Bindungsstellen zu besetzen.

Am nächsten Tag wurde die Membran für 10min in 1xTBST gewaschen und danach für 1–2h mit dem primären Antikörper in 1xTBST und 0,1% BSA inkubiert. Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die eingesetzten Antikörper:

Antikörper	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
anti-HCN1	rabbit	Alomone	1:1000
anti-HCN2	rabbit	Alomone	1:1000
anti-HCN2-Serum	rabbit	Ludwig <i>et al.</i> , 2003	1:2000
anti-Src	mouse	upstate	1:500
anti-PP2A/α	rabbit	Sigma	1:400
anti-myc	mouse	NEB Cell Signaling	1:5000
anti-GST	mouse	Sigma	1:5000
anti-RGS-His	mouse	Qiagen	1:4000

Es folgten 3 weitere Waschschrte mit 1xTBST, nach denen die Membran für 1h mit dem entsprechenden sekundären Antikörper hybridisiert wurde.

Antikörper	Ursprung	Hersteller	Verdünnung
anti-rabbit	donkey	Amersham	1:3000
anti-mouse	sheep	Amersham	1:3000

Anschließend wurde die Membran 4x mit 1xTBST und 2x mit MQ gewaschen, bevor sie für 1min mit ECL-Reagenz (Amersham) inkubiert wurde. Die Banden wurden durch das Auflegen eines Filmes (Hyperfilm ECL, Amersham) in der Dunkelkammer visualisiert.

2.15 Ko-Immunpräzipitation

Protein-Protein-Interaktionen können durch Fällung eines Proteinkomplexes mit einem spezifischen Antikörper gegen ein Protein und Nachweis durch Western Blot mit einem Antikörper gegen ein weiteres im Komplex enthaltenes Protein nachgewiesen werden. Zum Isolieren des Proteinkomplexes aus einem Lysat verwendet man Protein A Sepharose-Kügelchen („beads“) als feste, abzentrifugierbare Matrix. Es handelt sich hier um eine stabile, quervernetzte Form der Agarose, an die kovalent Protein A aus *Staphylococcus aureus* gebunden ist, das die Fähigkeit besitzt, Immunglobuline zu binden (Chenais *et al.*, 1977).

2.15.1 Verwendete Lösungen

Triton-Lysepuffer

HEPES pH7,5 (Sigma)	50mM
NaCl	150mM
Glycerol	10%
EDTA pH8,0	5mM
Triton X-100 (Roth)	1%

HNTG-Puffer

HEPES pH7,5	50mM
NaCl	150mM
Glycerol	10%
EDTA pH8,0	5mM
Triton X-100	0,1%

Beiden Puffern wurde vor Gebrauch ein Gemisch an Protease-Inhibitoren zugegeben. Die Lösungen wurden bei -20°C gelagert und für jeden Gebrauch frisch zu den Lysepuffern im Verhältnis 1:1000 (Ausnahme Jodacetamid 1:300) gegeben.

Proteaseinhibitoren

Benzamidin (Sigma)	1M	in MQ
Jodacetamid (Sigma)	300mM	in MQ
Antipain (Calbiochem)	1mg/ml	in 50% EtOH
Leupeptin (Calbiochem)	1mg/ml	in 50% EtOH
Pepstatin A (Sigma)	1mM	in 50% EtOH
1,10-Phenanthrolin (Fluka)	1M	in 100% EtOH
PMSF (Fluka)	100mM	in 100% EtOH

2.15.2 Zellkultur und -lyse

Zwei Proteine, deren Interaktion untersucht werden sollte, wurden nach Ko-Transfektion der entsprechenden cDNAs in HEK Zellen heterolog exprimiert. In 6-Lochplatten wurden je 700000 Zellen ausgesät und pro Loch 0,6µg cDNA jedes Plasmids mit Fugene[®] 6 transfiziert. Je eines von beiden Proteinen war zu diesem Zweck mit einem myc-tag versehen, um dieses mittels eines monoklonalen Antikörpers später isolieren bzw. nachweisen zu können. Um zu vermeiden, daß FBS aus dem Zellmedium unspezifisch an die Protein A-Sepharose bindet, wurden die Zellen nach 72-stündiger Inkubation vor der Lyse 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Loch 500µl Triton-Lysepuffer zugegeben, die Zellen mit einem Plastik-Schaber von der Oberfläche gelöst und für 10min auf Eis inkubiert. Triton X-100 ist ein Detergens, das die Zellmembran lysiert, den Zellkern und andere intrazelluläre Kompartimente aber intakt läßt. Diese werden durch eine Zentrifugation für 30min bei 12000xg und 4°C abgetrennt. Die gelösten Zellmembranbestandteile befinden sich im Überstand und können nun für die Ko-Immunpräzipitation verwendet werden.

2.15.3 Durchführung der Ko-Immunpräzipitation

Für die Ko-Immunpräzipitation wurden 500µl Zelllysate mit 30µl Protein A Sepharose-Kügelchen in PBS, 1µl anti-myc-Antikörper und 500µl HNTG-Puffer in ein cap pipettiert und

über Nacht bei 4°C auf einem Rollhybridisierer inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5min bei 12000xg und 4°C wurde der Überstand abgenommen und die beads 3x mit HNTG-Puffer + PI gewaschen. Nach einer SDS-Gelelektrophorese wurde das zweite Protein mit einem spezifischen Antikörper im Western Blot nachgewiesen. Als Negativ-Kontrolle diente ein Ansatz mit einem Nonsense-Antikörper (z.B. anti-Transducin, Firma??) in der üN-Inkubation.

2.16 GST Pulldown Assay

Glutathion-S-Transferasen (GST) sind Enzyme, die sowohl in Bakterien als auch in Säugetieren vorkommen. Sie katalysieren unter Bildung von Thioethern die Reaktion von Glutathion mit einem breiten Spektrum organischer Verbindungen. Hierdurch werden zahlreiche Karzinogene und Xenobiotika, wie z.B. luft- und wasserverunreinigende Substanzen, einem allgemeinen Entgiftungsprozeß zugeleitet. Somit wird der Angriff von Sauerstoffradikalen dieser Verbindungen, die durch cellulläre oxidative Prozesse (z.B. über Cytochrom P450) entstehen, auf die zellulären Nukleinsäuren und Lipide verhindert.

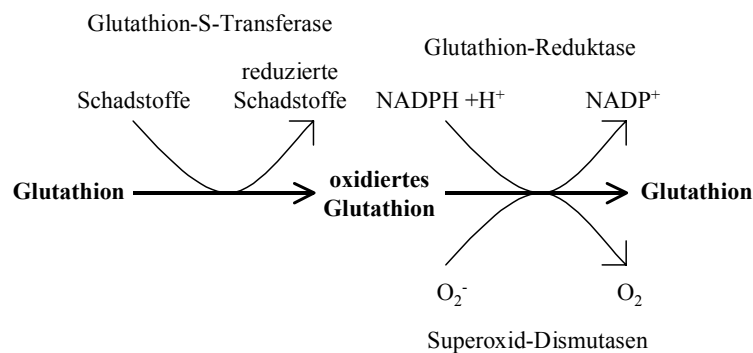


Abb. 2.16-1: Schema zur Rolle der GST im oxidativen Stress

Im GST Pulldown Assay macht man sich die Affinität von GST zu Glutathion zunutze. Dieses System ist vielseitig nutzbar für die Expression, Aufreinigung und Detektion von Fusionsproteinen, die in *E. coli* produziert wurden. Es basiert auf einer induzierbaren Überexpression von Genen oder Genfragmenten als Fusionsprotein mit *Schistosoma japonicum* GST. Nach Transformation der entsprechenden DNA im Vektor pET41a in *E. coli* wird ein Fusionsprotein mit dem GST-Anteil am Aminoterminus und dem zu untersuchenden Protein am Carboxyterminus exprimiert. Das Protein sollte sich im Cytoplasma anhäufen. Das GST-Protein tritt mit einem Molekulargewicht von 35kDa auf (nativ 26kDa) und wird mit voller enzymatischer Aktivität exprimiert. Anschließend kann es durch Affinitätschromatographie oder im Batch-Verfahren mit immobilisiertem Glutathion aus bakteriellen Lysaten aufgereinigt werden.

2.16.1 Verwendete Lösungen

AM-X-Puffer		1 x PBS, pH7,4
Tris-HCl pH7,9	20mM	(siehe 2.12.3)
MgCl ₂	5mM	
EDTA	0,2mM	
KCl	XmM	
DTT	0,5mM	
Glycerol	20%	

Der AM-Puffer wurde in zwei Konzentrationen hergestellt: mit 0mM und mit 1000mM KCl. Die Puffer wurden nicht autoklaviert und bei 4°C gelagert. Für verschiedene KCl-Konzentrationen wurden beide Puffer in entsprechenden Mengenverhältnissen gemischt.

2.16.2 Konstruktion des Fusionsproteins

Für den GST Pulldown Assay wurde die entsprechende cDNA in den Vektor pET41a kloniert. Nach Transformation in Bakterienzellen und Induktion durch IPTG wird ein Fusionsprotein exprimiert, das den GST-Anteil und einen His-tag am N-terminalen Ende trägt, während das zu untersuchende Protein den Carboxyterminus einnimmt.

2.16.3 Expression und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins

Das durch Sequenzieren auf seine Richtigkeit überprüfte Konstrukt wurde in protease-defiziente *E. coli* BL21 (DE3) Zellen transformiert (2.9.3.2). Eine Kolonie der Transformanten wurde über Nacht in 7ml LB-Medium mit Kanamycin bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Kolonie in 100ml LB_{Kan} überimpft (~ 1:10 verdünnt) und weiter geschüttelt, bis die OD_{600nm} zwischen 1,2 und 1,5 lag. Es wurden 50µl der Zellen als Probe 0C (null control) entnommen. Dann wurde die Expression des Fusionsproteins mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,1mM induziert, die Zellen für eine weitere Stunde geschüttelt und dann geerntet, indem sie in einem großen Zentrifugen-Becher im Rotor JLA10.5 in einer Beckmann-Zentrifuge für 10min bei 5000rpm und 4°C abzentrifugiert wurden. Vor dem Zentrifugieren wurden wieder 50µl als Probe IC (induced control) entnommen. Das Zellpellet wurde in 4ml PBS + PI resuspendiert, in geeignete Gefäße umgefüllt und nach einem „freeze-thaw“-Zyklus (einfrieren in Ethanol/Trockeneis, auftauen bei 40°C im Wasserbad) mit Lysozym (Sigma) in einer Endkonzentration von 5mg/ml für 30min auf Eis lysiert. Nach Zugabe von 1% Triton X-100 (Roth) wurde der Ansatz für weitere 30min bei RT horizontal geschüttelt, um die Löslichkeit des Fusionsproteins zu verbessern, und dann für 30min bei 13000rpm und 4°C abzentrifugiert. Vom Überstand, in dem sich auch das Fusionsprotein befindet, wurden 50µl als Probe S („supernatant“) entnommen, der Rest wurde in Aliquots zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde mit 150µl PBS + PI versetzt und kräftig gemischt. Anschließend wurden auch hiervon 50µl als Probe CP („cell debris pellet“) entnommen.

Zur Aufreinigung wurde nun der Überstand mit 1Vol 50% Glutathion-Sepharose 4B-beads (Amersham) üN bei 4°C auf dem Rollhybridisierer inkubiert. Die beads waren zuvor nach Herstellerangaben mit PBS+PI oder AM-X+PI von Ethanol befreit und verdünnt worden. Am nächsten Tag wurden die beads für 5min bei 500xg und 4°C abzentrifugiert, vom Überstand eine 50µl Probe (Ü, Überstand) genommen und der Rest verworfen. Daraufhin wurden die beads 2x mit PBS+PI gewaschen, mit den Überständen wie oben verfahren (Proben W2, W3). Zum Schluß wurden die beads mit 1Vol PBS+PI versetzt und bei 4°C gelagert. Alle Proben wurden mit 15µl 4x Lämmli versetzt und bis zum Auftrag auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel bei -20°C gelagert. Zur Kontrolle der ersten Aufreinigungsversuche wurden je 15µl der mit Lämmli versetzten Proben auf ein dünnes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Lösung angefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen (2.14.3).

2.16.4 Durchführung des GST Pulldown Assays

Für den GST Pulldown Assay wurden 50µl der mit GST-Fusionsprotein beladenen und bei 4°C gelagerten Glutathione-Sepharose-beads mit 100µl HEK293-Zelllysate in Triton-Lysepuffer (bzw. 200µl Bakterien-Lysat in PBS) in einem cap gemischt und über Nacht bei 4°C auf einem Rollhybridisierer inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die beads für 5min bei 3000rpm und 4°C abzentrifugiert und vom Überstand 50µl als Probe behalten. Das Pellet wurde zweimal mit PBS+PI bzw. AM-X+PI gewaschen und abschließend in 1Vol PBS+PI bzw. AM-X+PI aufgenommen und mit der entsprechenden Menge Lämmli versetzt. Nach 5min Denaturierung bei 95°C im Wasserbad wurden die Proben auf ein dünnes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Proteine mittels folgender Western Blot Analyse sichtbar gemacht (2.14).

3 ERGEBNISSE

Ziel dieser Arbeit war es, mittels verschiedener Methoden wie dem Zwei-Hybrid-System, der Ko-Immunpräzipitation und dem GST Pulldown Interaktionen des C-Terminus des mHCN2-Kanals mit verschiedenen intrazellulären Bereichen desselben Kanals zu untersuchen sowie neue Interaktionspartner des mHCN2 aus einer Maus-Herz cDNA-Bibliothek zu identifizieren.

3.1 Klonierung des Köderproteins mHCN2-C

Der erste Schritt des Zwei-Hybrid-Systems bestand in der Konstruktion des Fusionsproteins aus dem mHCN2-C-Terminus und dem LexA-Protein. Als Ausgangs-DNA wurde mHCN2/pcDNA3 (Ludwig *et al.*, 1998) verwendet. Mit diesem Konstrukt als template wurde das von den Primern HA1F/207R flankierte Stück amplifiziert, mit EcoR I und Bgl II geschnitten, über ein präparatives PAGE aufgereinigt und eluiert. Außerdem wurde aus diesem Konstrukt der mittels PCR schwer zu amplifizierende GC-reiche C-Terminus mit den Enzymen Bgl II und Not I herausgeschnitten, über ein präparatives Agarosgel aufgereinigt und eluiert. Beide Teilstücke wurden zusammen „in frame“ mit LexA in den mit EcoR I und Not I geschnittenen, mit CIP behandelten Vektor pEG202 ligiert. Nach Transformation in *E. coli* wurde das Plasmid vermehrt und isoliert. Zur Kontrolle der korrekten Sequenz und des richtigen Leserahmens wurden das Insert, der Übergang zur LexA-Sequenz und der 3'-Übergang in den pEG202 Vektor sequenziert.

Später wurden zwei weitere Köderkonstrukte kloniert, die dem C-Terminus nach der CNBD bzw. den ersten 90AS nach der CNBD entsprachen. Für mHCN2-C2 wurde ein Teilstück von 423bp mittels PCR mit dem Primerpaar HA60F/HA61R und mit mHCN2-C/pEG202 als template amplifiziert, mit EcoR I und Xho I verdaut und über ein präparatives PAGE aufgereinigt. Gleichzeitig wurde der restliche C-Terminus mit Xho I und Not I aus dem Konstrukt geschnitten (512bp) und ebenfalls über ein präparatives PAGE aufgereinigt. Beide Teilstücke wurden zusammen im richtigen Leserahmen mit LexA in den mit EcoR I und Not I geschnittenen, mit CIP behandelten Vektor pEG202 ligiert. Nach Transformation in *E. coli* wurde das Plasmid mHCN2-C2 vermehrt und isoliert. Durch Sequenzierung wurden die korrekte Sequenz und die Übergänge an den Schnittstellen kontrolliert. Das Fragment für mHCN2-C4 wurde mit EcoR I und Pst I aus dem Konstrukt mHCN2-C2 ausgeschnitten, über ein präparatives PAGE aufgereinigt und in den mit EcoR I und Pst I geöffneten, dephosphorylierten Vektor pEG202 ligiert. Ein stark vereinfachtes Schema der klonierten Bereiche zeigt Abb. 3.3-1.

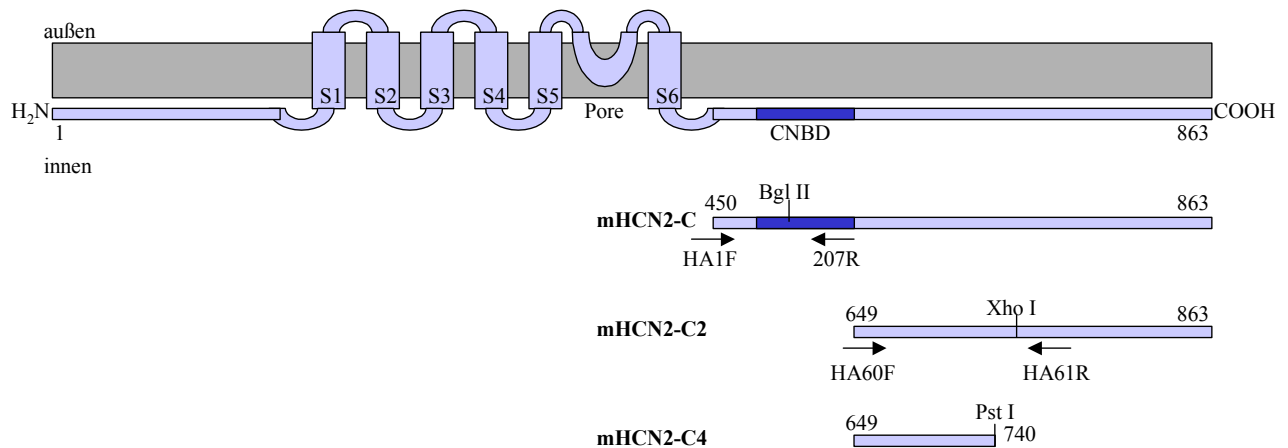


Abb. 3.1-1: schematische Darstellung der mHCN2 Konstrukte C, C2 und C4 im Vektor pEG202

Die Abbildung zeigt ein stark vereinfachtes Schema der Proteinstruktur des mHCN2 mit den 6 Transmembrandomänen (S1-S6), dem positiv geladenen Spannungssensor S4, der Pore und der CNBD und die relative Lage der korrespondierenden cDNA-Sequenz des mHCN2-C, der als Köderprotein verwendet wurde. mHCN2-C2 und -C4 wurden später eingesetzt, um den Bereich, in dem die Interaktion stattfindet, einzugrenzen. Die für die Klonierung verwendeten Primer (Pfeile) und Enzyme sind eingezeichnet. Die Zahlen beziehen sich auf Aminosäurereste.

Außerdem wurden entsprechende Konstrukte des hHCN4 kloniert, um später Aussagen treffen zu können, ob Proteine, die bei der Untersuchung einer cDNA-Bibliothek an mHCN2-C binden, auch mit hHCN4 interagieren. Der erste Schritt bestand darin, den Expressionsvektor hHCN4/pcDNA3 (A. Ludwig) mit dem Enzym Dra I zu öffnen, zu dephosphorylieren und durch eine Adapterligation einen Sal I-Adaptor anzufügen. Anschließend mußte die DNA phosphoryliert werden, um eine spätere Ligation zu ermöglichen. Daraufhin wurde die DNA mit Sst I verdaut, über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und in den mit Sal I und Sst I geschnittenen, mit CIP behandelten Vektor pBluescriptKS zwischenligiert. Für hHCN4-C wurde dann mit hHCN4/pcDNA3 als template und dem Primerpaar HA2F/HA8R eine PCR durchgeführt, das PCR-Produkt mit Sst I (Primer) und BstX I verdaut und über ein präparatives PAGE aufgereinigt. Dieses Fragment wurde gegen den kompletten vorderen Teil des Kanals im pBluescriptKS ausgetauscht. Das fertige Konstrukt wurde nun mittels EcoR I (Primer) und Sal I (Adaptor) aus pBluescriptKS ausgeschnitten und in den mit denselben Enzymen geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pEG202 ligiert. Analog wurde für hHCN4-C2 verfahren, allerdings wurde hierfür das Primerpaar HA3F/HA8R (mit entsprechenden Schnittstellen in HA3F) in die PCR eingesetzt. Für hHCN4-C4 wurde ausgehend von hHCN4-C2 ein Stück mit EcoR I und BamH I ausgeschnitten und nach der Aufreinigung über ein präparatives Agarosegel in den Vektor pEG202 kloniert. Die Inserts und Schnittstellen aller Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Abb. 3.1-2 zeigt einen Überblick über die Lage der klonierten Konstrukte des hHCN4.

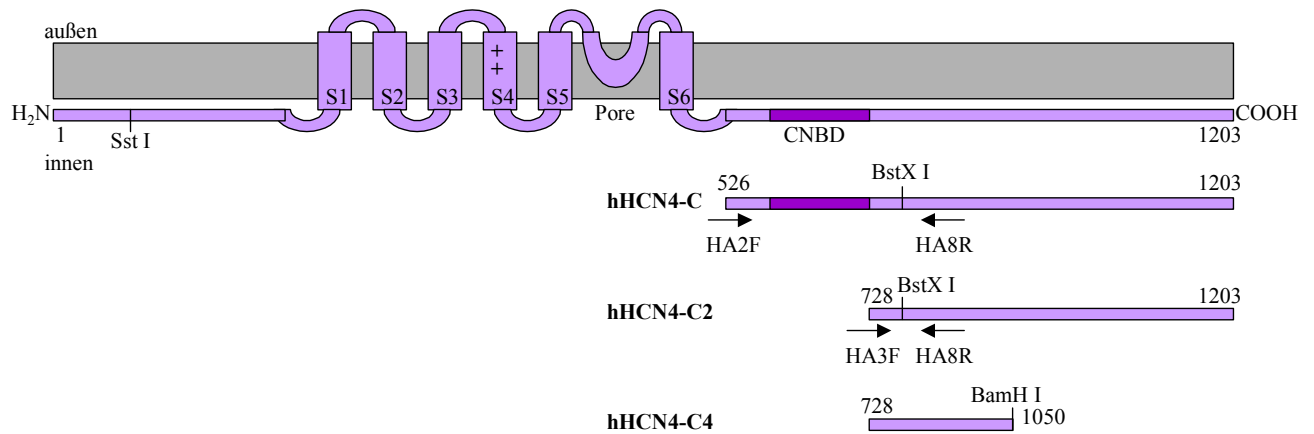


Abb. 3.1-2: schematische Darstellung der hHCN4 Konstrukte C, C2 und C4 im Vektor pEG202

Die Abbildung zeigt ein stark vereinfachtes Schema der Proteinstruktur des hHCN4 mit den 6 Transmembrandomänen (S1-S6), dem positiv geladenen Spannungssensor S4, der Pore und der CNBD und die relative Lage der korrespondierenden cDNA der hHCN4-C, -C2 und -C4 Konstrukte. Die für die Klonierung verwendeten Primer (Pfeile) und Enzyme sind eingezeichnet. Die Zahlen beziehen sich auf Aminosäurereste.

In Vorversuchen wurde anschließend das Verhalten der Köderproteine in EGY48 Hefezellen durch eine Reihe von Kontrollexperimenten charakterisiert. Es mußte gezeigt werden, daß die Fusionsproteine stabil exprimiert werden, daß sie fähig sind, in den Kern einzudringen, und daß sie an den LexA-Operator binden können. Es durfte des weiteren keine unspezifische oder vorzeitige Transkriptionsaktivierung erfolgen (Ausubel *et al.*, 1995). Für diese Kontrollen wurde eine Reihe von Transformationen in EGY48 WT Hefezellen (2.11.8.1) mit verschiedenen Plasmidkombinationen durchgeführt, die Hefen auf den entsprechenden Selektiv-Medien (2.11.3) ausgestrichen und analysiert. Tab. 3.1-A zeigt eine Übersicht über die jeweils in Kombination transformierten Plasmide, die durchgeführten Versuche und die Auswertung am Beispiel des Köderproteins mHCN2-C.

Tab. 3.1-A: Übersicht über die transformierten Plasmidkombinationen für die Vorversuche

Transformation	Plasmide	Selektivplatten	Versuch	Ergebnis	Interpretation
I	mHCN2-C/pEG202	Glu –Ura -His	Filterassay mit X-Gal	weiße Kolonien	keine Aktivierung des <i>lacZ</i> -Gens
	pSH18-34				
II	pSH17-4	Glu –Ura -His	Filterassay mit X-Gal	blaue Kolonien (Positivkontrolle)	Aktivierung des <i>lacZ</i> -Gens
	pSH18-34				
III	pRFHM1	Glu –Ura -His	Filterassay mit X-Gal	weiße Kolonien (Negativkontrolle)	keine Aktivierung des <i>lacZ</i> -Gens
	pSH18-34				
IV	mHCN2-C/pEG202	Glu –Ura -His		Wachstum	keine Aktivierung des <i>Leu2</i> -Gens,
	pSH18-34				
V	mHCN2-C/pEG202	Glu –Ura –His -Leu		kein Wachstum	Hefen benötigen Leucin im Medium
	pSH18-34				
VI	mHCN2-C/pEG202	Glu –Ura -His	Filterassay mit X-Gal	weiße Kolonien	Hemmung des konstitutiven <i>lacZ</i> -
	pJK101				
VII	pRFHM1	Glu –Ura -His	Filterassay mit X-Gal	weiße Kolonien (Positivkontrolle)	Gens durch LexA- Bindung
	pJK101				
VIII	-----	Glu –Ura	Filterassay mit X-Gal	blaue Kolonien (Negativkontrolle)	<i>lacZ</i> -Reportergen konstitutiv aktiv
	pJK101				

Bei den Transformationen I-III handelte es sich um den „**Activation Assay**“ (2.11.7.1), der zeigen sollte, daß das LexA-mHCN2-C Fusionsprotein durch die Bindung an den LexA-Operator des *lacZ*- Reportergens dessen Aktivierung nicht unspezifisch auslöste, d.h. daß die Hefezellen weiß blieben. Die Transformationen II und III dienten dabei als Positiv- (Aktivierung des *lacZ*-Gens, blaue Kolonien) bzw. als Negativkontrolle (keine Aktivierung des Reportergens, weiße Kolonien).

Bei den Transformationen IV und V handelte es sich um den Test des „**Leu requirements**“ (2.11.7.3), der zeigen sollte, daß die Hefen auf den Zusatz von Leucin im Medium angewiesen waren, d.h. daß die Hefezellen auf Leucin-defizientem Medium nicht zu wachsen vermochten. Wären die Hefen zum Wachstum auf Leucin-defizientem Medium befähigt, wäre das ein Hinweis auf eine unspezifische Transkriptionsaktivierung des *Leu2*-Gens gewesen, der Köder wäre somit unbrauchbar gewesen.

Bei den Transformationen VI bis VIII handelt es sich um den „**Repression Assay**“ (2.11.7.2), der zeigen sollte, daß das konstitutiv aktive *lacZ*-Gen des pJK101 Vektors durch Bindung des Köderproteins an den LexA-Operator gehemmt wurde, d.h. daß das Fusionsprotein an den LexA-Operator gebunden hat und im Kern lokalisiert war. Die Transformationen VII und VIII dienten dabei als Positiv- (keine Aktivierung des *lacZ*-Gens, weiße Kolonien) bzw. als Negativkontrolle (konstitutiv aktives *lacZ*, blaue Kolonien).

Das für den Bibliotheksscreen eingesetzte Köderprotein mHCN2-C hat alle Bedingungen der Vorversuche erfüllt.

Köderprotein („bait“) wird als Fusionsprotein mit LexA exprimiert, was eine Bindung an die LexA-Operatoren der Reportergene ermöglicht, aber nicht zu deren Aktivierung führt. Das Beuteprotein („prey“) wird als Fusionsprotein mit einer transkriptionsaktivierenden Domäne exprimiert, allerdings nur, wenn Galaktose im Medium vorhanden ist, da es unter der Kontrolle eines GAL1-Promotors steht. Falls es zu einer Interaktion von Köder- und Beuteprotein kommt, befindet sich die transkriptionsaktivierende Domäne über die Interaktion in unmittelbarer Nähe der DNA-Bindungsdomäne, so daß die Transkription aktiviert wird. Für diese Analyse wurden je drei verschiedene Plasmide in Hefezellen transformiert. In einem ersten Ansatz wurden mHCN2-N, –L23 und –L45 gegen die LexA-Fusionsproteine mHCN2-C und –C2 getestet.

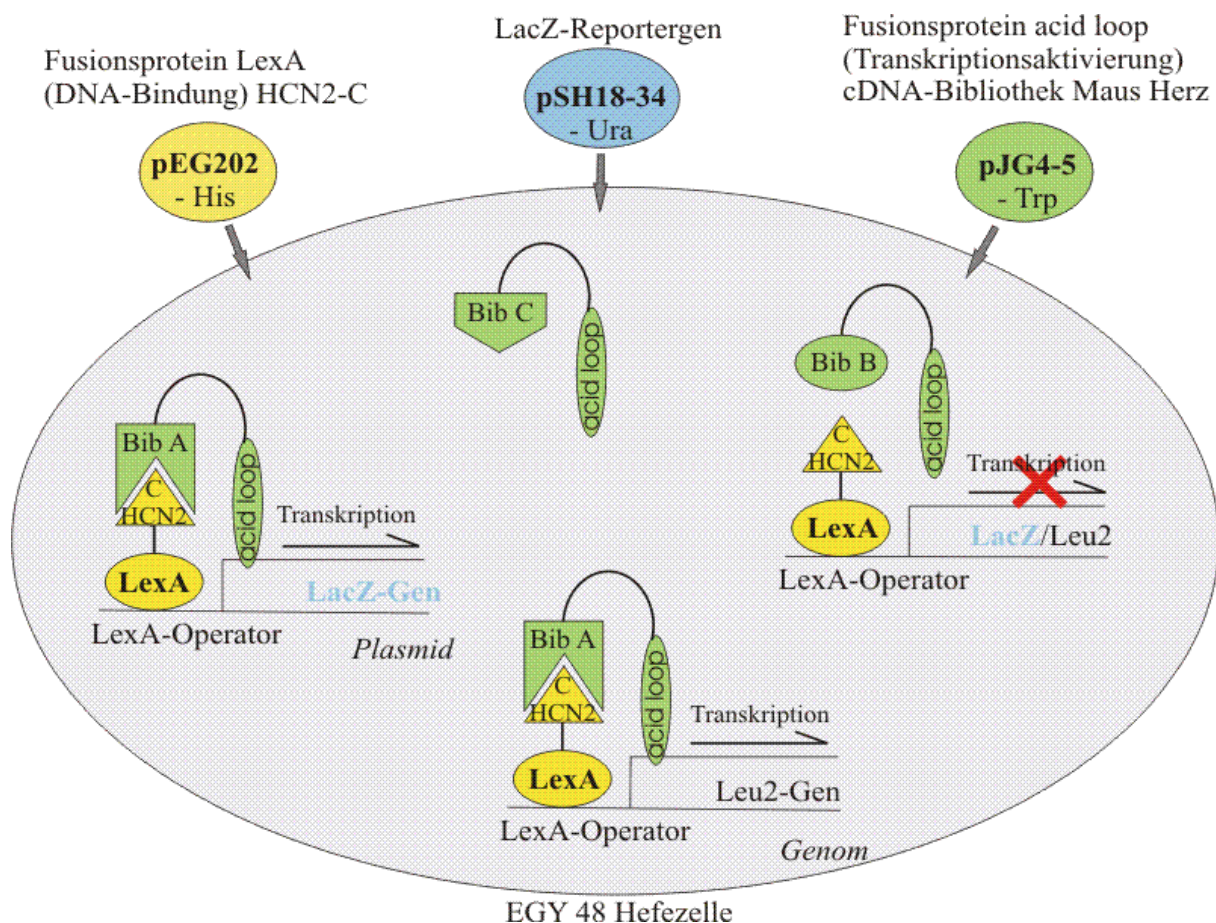


Abb. 3.3-2: schematische Darstellung der Funktionsweise des Zwei-Hybrid-Systems

Eine detaillierte Beschreibung findet sich unter 2.11.

Das Verhalten der Hefezellen auf den verschiedenen Kulturbedingungen in Abb. 3.2-2 zeigt, daß mHCN2-N nicht mit mHCN2-C oder –C2 interagiert, da keine Blaufärbung der Zellen auf der Gal/Raff/X-Gal –Ura –His –Trp-Platte (Spalte A) zu erkennen ist. Zusätzlich müßten die Zellen durch eine Interaktion dazu befähigt sein, auf Gal/Raff –Ura –His –Trp –Leu-Platten (Spalte C) zu wachsen, was nicht der Fall ist. Spalte B und D dienten als Negativkontrollen, um zu zeigen, daß die Blaufärbung bzw. das Wachstum spezifische Reaktionen darstellen. Über eine Interaktion zwischen mHCN2-L23 oder –L45 und mHCN2-C oder –C2 ist keine eindeutige Aussage möglich. Die Hefezellen färben sich auf den

Gal/Raff/X-Gal –Ura –His –Trp-Platten (Spalte A) leicht bläulich, allerdings wesentlich schwächer als die Positivkontrolle. Die weißen Hefezellen auf den Glu/ X-Gal –Ura –His –Trp-Platten zeigen, daß es sich bei der Blaufärbung um eine spezifische Reaktion handelt. Das nicht vorhandene Wachstum von Hefezellen mit diesen Plasmidkombinationen auf den Gal/Raff –Ura –His –Trp –Leu-Platten spricht jedoch gegen eine Interaktion.

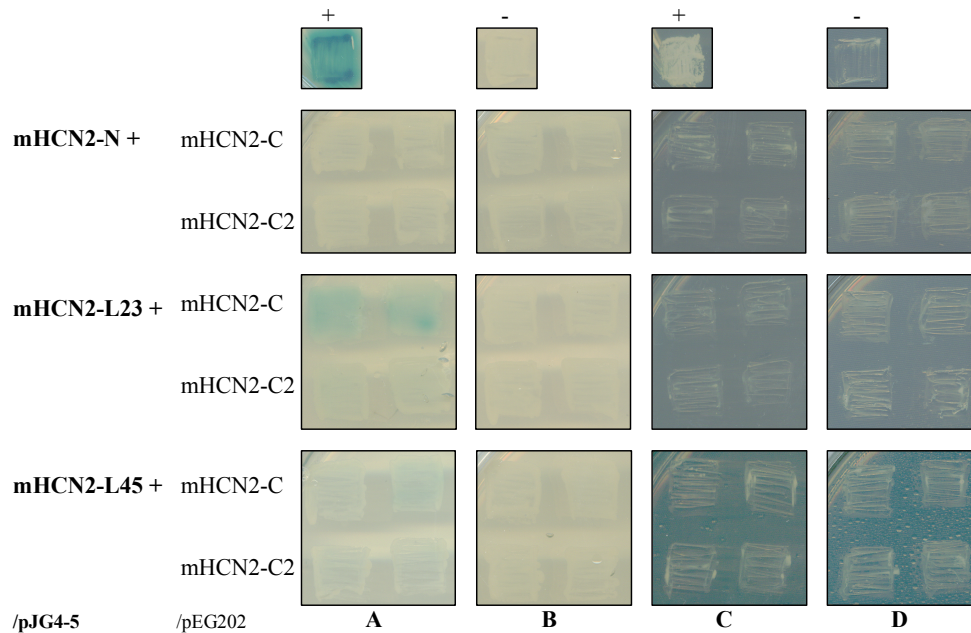


Abb. 3.2-2: Test auf Galaktose-Abhängigkeit zwischen verschiedenen HCN-Konstrukten

Aufsicht auf Hefeplatten mit je zwei unabhängigen Hefeklonen, die die angegebenen Plasmide sowie das lacZ-Reporterplasmid pSH18-34 enthalten. Oben sind jeweils eine Positiv- (mHCN2-C + 9K/pJG4-5 + pSH18-34) und eine Negativkontrolle (mHCN2-C + pRFHM1 + pSH18-34) abgebildet. Die vier Spalten entsprechen den vier verschiedenen Bedingungen: Gal/Raff/X-Gal –Ura, –His, –Trp (A), Glu/X-Gal –Ura, –His, –Trp (B), Gal/Raff –Ura, –His, –Trp, –Leu (C) und Glu –Ura, –His, –Trp, –Leu (D)

Mit dem Zwei-Hybrid-System konnte gezeigt werden, daß der C-Terminus des mHCN2-Kanals nicht mit dem N-Terminus des selben Kanals interagiert. Für mHCN2-L23 und –L45 ist die Auswertung nicht eindeutig.

3.3 Interaktionspartner von mHCN2

3.3.1 Yeast Two Hybrid Screen

Für die Identifizierung von Interaktionspartnern des C-Terminus des mHCN2 mit Hilfe einer Maus-Herz-cDNA-Bibliothek wurde das Zwei-Hybrid-System in Hefen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde der komplette C-Terminus des mHCN2 (mHCN2-C) als Köderprotein eingesetzt, die Beuteproteine bestanden aus den Genprodukten der cDNA-Bibliothek.

3.3.1.1 Präparation der cDNA-Bibliothek

Nachdem alle Vorversuche mit dem Köderprotein mHCN2-C erfolgreich verlaufen waren (3.1), wurde die zu untersuchende cDNA-Bibliothek hergestellt. Ausgehend von je 3 µg poly(A) RNA wurde in zwei parallelen Ansätzen in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen cDNA hergestellt (2.10.3). Je ein Ansatz war dabei mit $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP markiert, um die Ausbeute berechnen zu können. Diese betrug für den ersten synthetisierten Strang 0,1756 µg, für den zweiten Strang 0,326 µg. Die insgesamt 500 ng cDNA wurden für die Adapterligation und den Xho I-Verdau eingesetzt. Nach der Verteilung auf zwei Spuren eines 1%igen „low melting“ Agarosegels wurde die gesamte DNA zwischen den Auftragstaschen und der 1 kb-Bande unter UV-Licht ausgeschnitten, in drei Stücke zerteilt (1 A/B/C, 2 A/B/C) und mittels Gelase wieder aus dem Gel eluiert. Anschließend wurde noch einmal die Radioaktivität gemessen, um auf die in den Proben enthaltene cDNA-Menge schließen zu können. In den Proben 1 war der erste Strang markiert und es ergaben sich folgende Mengen: 1A 5,6 ng, 1B 26,2 ng, 1C 16,3 ng. Für den markierten zweiten Strang in den Proben 2 ergaben sich folgende Mengen: 2A 72,7 ng, 2B 156,1 ng, 2C 39,3 ng. Daraufhin wurde die cDNA in dem Volumen MQ gelöst, das für jede Probe eine Endkonzentration von etwa 10 ng/µl ergab. Je 1 µl davon wurde in die Ligationen mit dem EcoR I und Xho I geschnittenen und CIP behandelten Vektor pJG4-5 eingesetzt. Nachdem die DNA der Ligationen durch Ethanol-fällung von Salzen befreit und in elektrokompente *E. coli* Zellen transformiert worden war, wurden einige Zellen zur Bestimmung der Transformationseffizienz ausplattiert, während die restlichen Zellen bis zu ihrer weiteren Verwendung als Glycerolstock bei -80°C gelagert wurden (2.9.3.4). Die Tab. 3.3-A zeigt eine Übersicht über die Anzahl der durchgeführten Ligationen, die jeweils eingesetzte cDNA und die Ausbeute unabhängiger Klone. In jeder Ligation treten die eingesetzten cDNAs zweimal auf, da der Ligationenansatz halbiert und in zwei Transformationen eingesetzt wurde. Fehlen in der Tabelle bei einer Ligation die doppelten Angaben, kam es bei der Transformation in die elektrokompenten *E. coli*-Zellen zu einem Kurzschluß und der Ansatz wurde verworfen.

Tab. 3.3-A: Übersicht über die Ausbeute der verschiedenen Ligationen

Ligation	cDNA	Klone/ml	Ligation	cDNA	Klone/ml
1	2A	6×10^3	4	2B	8×10^3
	2A	$2,2 \times 10^4$		2C	$2,4 \times 10^4$
	2B	$4,6 \times 10^4$		2C	$1,2 \times 10^4$
	2B	1×10^4	5	2A	1×10^4
2	2A	$1,6 \times 10^4$		2A	$1,2 \times 10^4$
	2A	$4,6 \times 10^4$		2B	$1,4 \times 10^4$
	2B	$1,1 \times 10^5$		2B	1×10^4
	2B	$6,8 \times 10^4$		2C	$6,2 \times 10^4$
3	1A	4×10^3		2C	$5,8 \times 10^4$
	1A	$2,4 \times 10^4$	6	2A	4×10^3
	1B	$5,2 \times 10^4$		2A	$1,6 \times 10^4$
	1B	8×10^3		2B	$1,2 \times 10^4$
	1C	$1,8 \times 10^4$		2B	$1,8 \times 10^4$
4	2A	4×10^3		2C	$1,8 \times 10^4$
	2B	1×10^4	Σ 1-6		$7,2 \times 10^5$

Nach 6 Ligationen, deren Klone stichprobenartig durch Alkalische Lyse auf ihre Inserts getestet worden waren, waren in den Glycerolstocks $7,2 \times 10^5$ unabhängige Klone repräsentiert. Daraufhin wurde die Plasmid-DNA wie unter 2.3.2 beschrieben aus den Glycerolstocks isoliert und photometrisch vermessen. Die Ausbeute betrug $1,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Zur Kontrolle der Insert-Variabilität wurden verschiedene Restriktionsverdaus durchgeführt. Für die Bibliothekstransformation (2.11.8.2) wurden $14 \mu\text{l}$ DNA in den 20fachen Ansatz eingesetzt (entspricht $1 \mu\text{g}$ pro Ansatz).

3.3.1.2 Identifizierung von Interaktionspartnern

Es wurde das Zwei-Hybrid-System in der Hefe angewendet, um im Herz vorkommende Proteine zu identifizieren, die selektiv mit dem C-Terminus des mHCN2 interagieren.

Im Zuge der Untersuchung von $7,2 \times 10^5$ unabhängigen Klonen auf eine Interaktion wurden 432 Klone von Gal/Raff –Ura –His –Trp –Leu-Platten gepickt. Von diesen Klonen erfüllten 170 die Bedingungen der Galaktose-Abhängigkeit. Zur Identifizierung der Fragmente aus der Maus Herz cDNA-Bibliothek wurden die Stücke direkt aus den Hefen mit dem Primerpaar TH5/TH7 amplifiziert (2.11.12), über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und mit dem Vorwärtsprimer TH5 ansequenziert. In der folgenden Tabelle 3.3-B sind die Ergebnisse des Sequenzvergleichs von Klonen, deren PCR-Produkt als eine distinkte Bande zu sehen war, mit der GenBank Datenbank (HUSAR) zusammengefaßt.

Tab.3.3-B: Zusammenfassung der Ergebnisse des Sequenzvergleichs verschiedener Klone mit der GenBank Datenbank (HUSAR)

<i>Klon</i>	<i>AccessionNr</i>	<i>Identität</i>	<i>Klon</i>	<i>AccessionNr</i>	<i>Identität</i>
11G	AB021743	PR65	35A	AY014180	Hs ubiquitin ligase E3
12E	AB021743	PR65	35H	AZ695416	
23K	AB021743	PR65	11D	BE448952	
23L	AB021743	PR65	25J	BF016278	ähnlich zu rPTP TD14
26E	AB021743	PR65	17C	BF534435	
30A	AB021743	PR65	9J	BF539058	
9K	AB021743	PR65	8K	BF687183	
31I	AF010305	Stra13 Helix-loop-helix	21D	BF782253	
31L	AF020771	importin a Q1	25I	BF789725	
17A	AF155909	cvHsp	29L	BG086229	
19C	AF155909	cvHsp	6D	BG174326	
21G	AF155909	cvHsp	29C	BG175220	
28E	AF155909	cvHsp	17K	BG242056	
13B	AF228058	Oracle	24D	BG246490	vermutlich Saposin
16D	AF228058	Oracle	31B	BG246490	vermutlich Saposin
21A	AF228058	Oracle	23B	BG261753	
34I	AF228058	Oracle	9G	BG261753	
8B	AF228058	Oracle	29K	D12644	MMKIF2
24B	AF267660	Pdk2	32C	D87911	PA28 gamma-UE
2C	AF267660	Pdk2	22D	HSM801843	
34F	AF267660	Pdk2	24F	MMAGRIN3	Agrin
35F	AF267660	Pdk2	7I	MMCATALAA	Katalase
35K	AF267660	Pdk2	23H	MMD677	SH3 d19
36J	AF267660	Pdk2	6A	MMLATS2	LATS2
7L	AF267660	Pdk2	3G	MMU27129	Hsp 73
31C	AF271072	TRIP2	30E	MMU76373	skm-BOP1(2)
9I	AI386339		34E	MMU76373	skm-BOP1(2)
27C	AI467412		36F	MMU76373	skm-BOP1(2)
34H	AI552244	ähnlich zu LIM	9A	MMU76373	skm-BOP1(2)
30H	AK002483		19J	MMU96635	ubiquitin protein ligase
32E	AK004884		36I	MMURNA	M83997
33A	AK014647		1C		Mitochondrion
35D	AX008900		34A		Mitochondrion

Von vielen der identifizierten Proteine ist keine funktionelle Bedeutung bekannt. Einige Klone wurden ausgeschlossen, da sie zu den häufigsten Falsch-Positiven des Zwei-Hybrid-

Systems gehören, wie z.B. ribosomale und mitochondriale Proteine, Cytochromoxidasen und Ubiquitin.

3.3.1.3 Bestätigung der Interaktionen

Aus der Vielzahl von Klonen wurden 4 Proteine für die Weiterbearbeitung ausgewählt:

PR65:

Bei PR65 handelt es sich um die strukturelle α -Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (PP2A) (Zolnierowics, 2000). Sie hat eine Größe von 65kDa und liegt assoziiert mit der katalytischen Untereinheit PP2Ac vor. Zusätzlich können noch bis zu 20 verschiedene modulatorische β -Untereinheiten an dieses Dimer binden, die aber nicht für die Funktionalität des Enzyms benötigt werden. Mutationen in der β -Isoform von PR65 wurden in Fällen von Lungen- und Kolontumoren, sowie von Melanomen und Brustkrebs gefunden. Strukturell fällt diese Enzym-Untereinheit durch HEAT-Motive auf, welche aus 37 – 43 Aminosäuren bestehen, die in 15 Wiederholungen auftreten. Diese Wiederholungen bilden kleine Einheiten aus je 2 nebeneinanderliegenden antiparallelen α -Helices, an deren „Kante“ Protein-Protein-Interaktionen möglich sind. Die HEAT-Motive 4-6 von PR65 binden wahrscheinlich regulatorische β -Untereinheiten, während über die HEAT-Motive 13-15 die katalytische Untereinheit gebunden wird. Die HEAT-Motive 3, 4, 12 und 13 bilden keine „Kante“, da in ihnen hydrophobe Konsensus-Aminosäuren ausgetauscht sind, was dem ansonsten regelmäßig geformten Protein eine hakenartige Form verleiht. In der entstehenden „Rinne“ könnten wiederum andere Proteine binden (Groves *et al.*, 1999; Kobe *et al.*, 1999). Die Proteinphosphatase 2A ist in allen eukaryotischen Zellen zu finden und liegt dort meist im Zytoplasma, seltener membrangebunden oder im Kern, vor. Für das PP2A-Dimer wurde auch eine Bindung an die C-terminalen 557AS des $\text{Ca}_v1.2$ -Kalziumkanals beschrieben, wo es der Kinasierung durch die PKA entgegenwirkt (Davare *et al.*, 2000). Für die weitere Untersuchung wurde die Phosphatase aufgrund potentieller Phosphorylierung des mHCN2-C-Terminus gewählt.

Oracle/Cypher:

Das Protein Oracle (Passier *et al.*, 2000) wurde annähernd zeitgleich mit dem Protein Cypher (Zhou *et al.*, 1999) beschrieben. Im Nukleinsäurevergleich unterscheiden sich die Sequenzen in einer Base (T1421A), die zu einem Aminosäureaustausch (S→T) führt. Von Oracle sind zwei Splicevarianten beschrieben, die mit zwei der sechs für Cypher identifizierten Splicevarianten übereinstimmen. Hierbei handelt es sich um je drei herz- sowie muskelspezifische Transkripte. Sie weisen eine PDZ-Domäne am Aminoterminus und drei LIM-Domänen am Carboxyterminus auf. Für Cypher wurde beschrieben, daß es über die PDZ-Domäne an α -Actinin-2 gebunden ist und über die LIM-Domäne mit der Proteinkinase C interagiert, von der es phosphoryliert wird. Aufgrund seiner überwiegenden Expression im quergestreiften Muskel des Herzens wurde Oracle/Cypher für die weitere Untersuchung ausgewählt. Cypher kann ab dem embryonalen Tag 8,5 nachgewiesen werden, es spielt keine Rolle bei der Entwicklung des Herzens. Es ist für die Aufrechterhaltung der Z-Scheibe im

quergestreiften Muskel unabdingbar, sobald Muskelkontraktionen stattfinden. Cypher^{-/-} Mäuse sterben durchschnittlich 24h nach der Geburt, sind zyanotisch, zeigen eine stark eingeschränkte Bewegung und haben nur wenig oder keine Milch im Magen. Untersuchungen an Herzen der Cypher^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern eine Blutstauung und eine Dilatation des rechten und linken Ventrikels. TEM-Analysen von Herzen ließen deutlich desorganisierte und unterbrochene Z-Scheiben erkennen, im Gegensatz zu relativ normalen M-Streifen (Zhou *et al.*, 2001).

cvHsp:

Das **cardiovaskuläre Heatshockprotein** ist ein 170 Aminosäuren großes Protein aus der Familie der small heat shock proteins (smHsp) (Krief *et al.*, 1999). Durch alternatives splicing entstehen drei verschiedene Transkripte. Der identifizierte Klon enthielt die Isoform 1. Beim Menschen wird dieses Protein hoch im Herzen und in insulinsensitiven Geweben exprimiert. Im Herzen ist eine Interaktion der Aminosäuren 65-119 mit α -Filamin beschrieben worden.

PTP TD14:

Die Protein-Tyrosin-Phosphatase TD 14 weist eine große Ähnlichkeit zur identifizierten Sequenz auf, wurde bisher aber nur in der Ratte beschrieben (Cao *et al.*, 1998). Dort ist sie allgemein von Bedeutung für myokardiales Wachstum und die Signaltransduktion im Herzen. Im N-Terminus befinden sich zwei potentielle SH3 Domäne-Bindungsstellen in einer Prolin-reichen Region. Das Protein weist keine enzymatische Aktivität auf, was eventuell auf einen Aminosäureaustausch (S→A) in der katalytischen Domäne zurückzuführen ist.

Von allen vier weiter zu untersuchenden Kandidaten wurden die PCR-Produkte, die für die Sequenzierung schon aufgereinigt worden waren, mit EcoR I und Xho I geschnitten, über ein Gel aufgereinigt und eluiert. Diese Fragmente wurden dann in eine Ligation mit dem mit EcoR I und Xho I geschnittenen und CIP behandelten Vektor pJG4-5 eingesetzt. Nach Transformation und Vermehrung in *E. coli* wurden die Konstrukte zusammen mit mHCN2-C und dem Reporterplasmid pSH18-34 in Hefezellen transformiert, um zu überprüfen, ob sich die Interaktion reproduzieren läßt. Zusätzlich wurden auch Plasmide für zwei Negativ-Kontrollen (mHCN2-C + pSH18-34 + pRFHM1, mHCN2-C + pSH18-34 + pJG/cGKI) transformiert, um die Detektion unspezifischer Interaktionen auszuschließen. pRFHM1 diente bereits im „Activation Assay“ als Negativkontrolle, pJG/cGKI (A. Koller) besitzt keinerlei Ähnlichkeit zu mHCN2-C und wurde sicherheitshalber als zweite Negativkontrolle eingesetzt. Nach Ausstreichen auf die Medien mit den vier Bedingungen zeigte sich, daß alle vier Proteine mit dem C-Terminus des mHCN2 interagierten.

Durch Sequenzierung wurden die Größe der Inserts und die Lage relativ zum Gen bestimmt, die bei den 7 gefundenen Klonen mit einem PR65-Insert variierten, ebenso wie bei den 5 Oracle-Klonen.

Tab. 3.3-C: Übersicht über Beginn und Ende der vertretenen Klone von PR65 und Ora

PR65		Oracle	
Klon-Nr.	Lage (bp)	Klon-Nr.	Lage (bp)
9K	853 – hinter Stop-Codon 1822	8B	1582 – n.d.
11G	895 – hinter Stop-Codon 1822	13B	1621 – n.d.
12E	1132 – hinter Stop-Codon 1822	16D	1582 - 2155
23K	853 – hinter Stop-Codon 1822	21A	1594 – n.d.
23L	955 – hinter Stop-Codon 1822	34I	1732 – hinter Stop-Codon 2245
26E	853 – hinter Stop-Codon 1822		
30A	853 – hinter Stop-Codon 1822		

Um die interagierende Region dieser Proteine weiter einzugrenzen, wurden mittels PCR zwei weitere Konstrukte amplifiziert und in den Vektor pJG4-5 kloniert: von PR65 die Basen 1132-1822 (Primer HA9F/HA10R), genannt PR65-k (230AS), und von Oracle die Basen 1732-2155 (Primer HA11F/HA12R), genannt Ora-k (141AS) (Abb. 3.3-1). Auch bei diesen neuen Konstrukten war die Interaktion mit mHCN2-C nachweisbar.

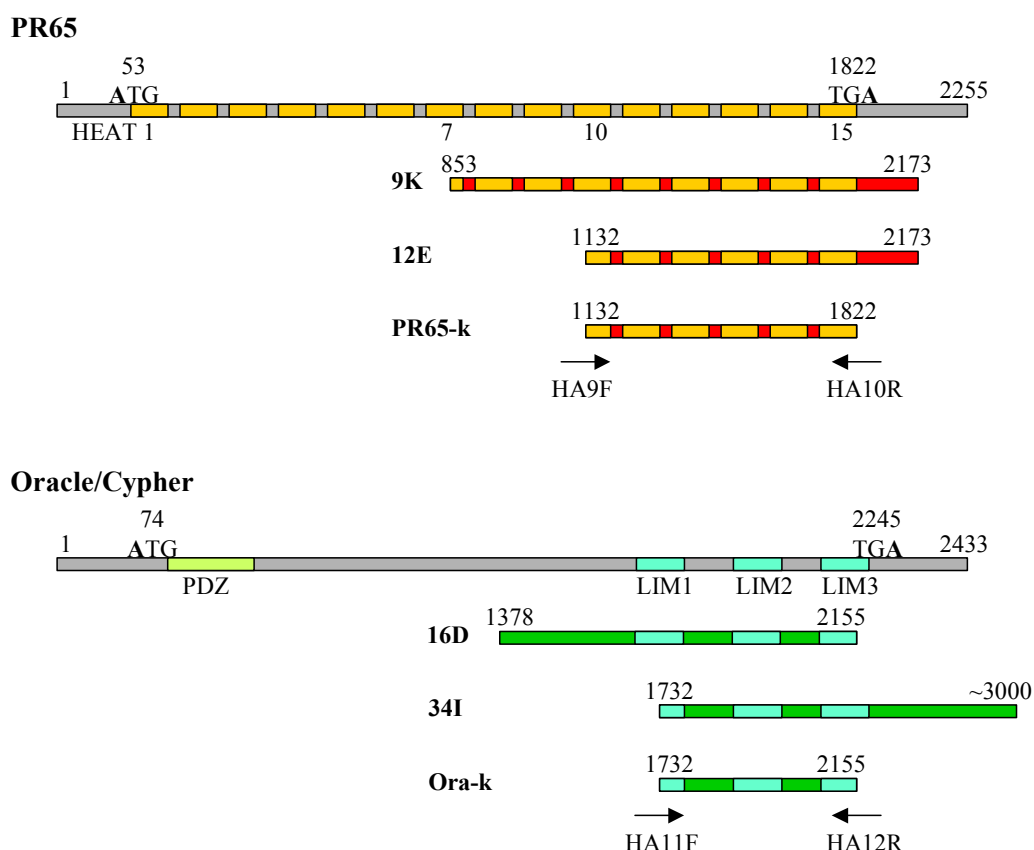


Abb. 3.3-1: schematische Darstellung der neu klonierten Regionen von PR65 und Oracle

Die Abbildung zeigt ein stark vereinfachtes Schema der Gene für PR65 und Oracle und verdeutlicht die Lage der neu klonierten PR65-k- und Ora-k-Konstrukte relativ zum Gen (nicht maßstabsgetreu). Zur Klonierung verwendete Primer sind eingezeichnet (Pfeile). Die Zahlen beziehen sich auf Basenpaare. Strukturelle Besonderheiten sind eingezeichnet (HEAT-Motive 1-15, PDZ-Domäne, Lim-Domänen).

In den Hefeklonen, in denen ein Insert mit cvHsp identifiziert worden war, enthielten die Plasmide pJG4-5 jeweils das gesamte Gen sowie weitere ca. 500bp hinter dem Stop-Codon (Abb. 3.3-2). Bei der Sequenzierung des gesamten Inserts zeigte sich bei PTP (Klon 25J), daß sich Introns in dem Klon befanden, weshalb über PCR ein neues Konstrukt PTP-k kloniert wurde, dessen Sequenz vom Anfang des ursprünglichen Klones bis zur Exon-Intron-Grenze reichte (Primer TH5/HA57R). Dieses Teilstück entsprach den Basen 3036-3591 (184AS) der Sequenz aus der Ratte. Auch bei diesem neuen Konstrukt war die Interaktion mit mHCN2-C vorhanden.

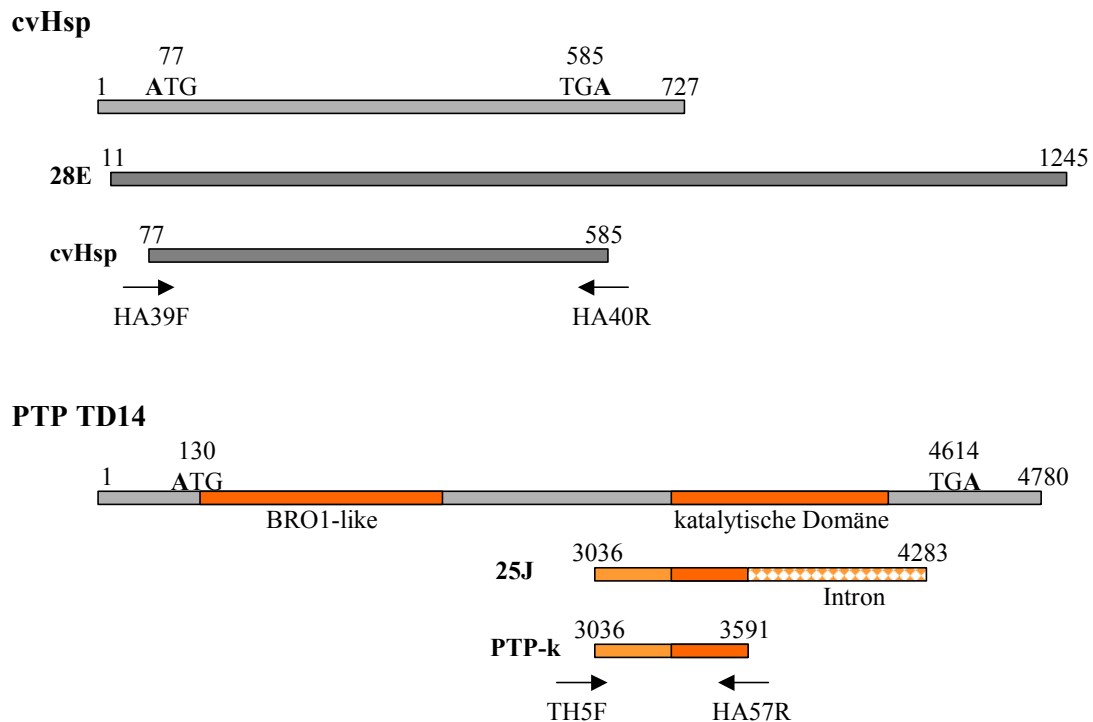


Abb. 3.3-2: schematische Darstellung der untersuchten Regionen von cvHsp und PTP TD14

Die Abbildung zeigt ein stark vereinfachtes Schema der Gene für cvHsp und PTP TD14 und verdeutlicht die Lage der untersuchten bzw. neu klonierten Bereiche relativ zum Gen (nicht maßstabsgetreu). Zur Klonierung verwendete Primer sind eingezeichnet (Pfeile). Die Zahlen beziehen sich auf Basenpaare. Strukturelle Besonderheiten sind eingezeichnet (BRO1-like, katalytische Domäne).

In Abb. 3.3-3 ist die Interaktion zwischen mHCN2-C und den vier Bibliotheksproteinen durch die starke Blaufärbung der Hefezellen auf den Gal/Raff/X-Gal –Ura –His –Trp-Platten (A) deutlich zu sehen. Die weißen Hefezellen auf den entsprechenden Glukose enthaltenden Platten (B) zeigen, daß die Reaktion spezifisch ist. Ebenso verhält es sich mit dem Wachstum der Hefezellen auf Gal-Raff –Ura –His –Trp –Leu-Platten (C), das auf Glu –Ura –His –Trp –Leu-Platten (D) nicht beobachtet werden kann.

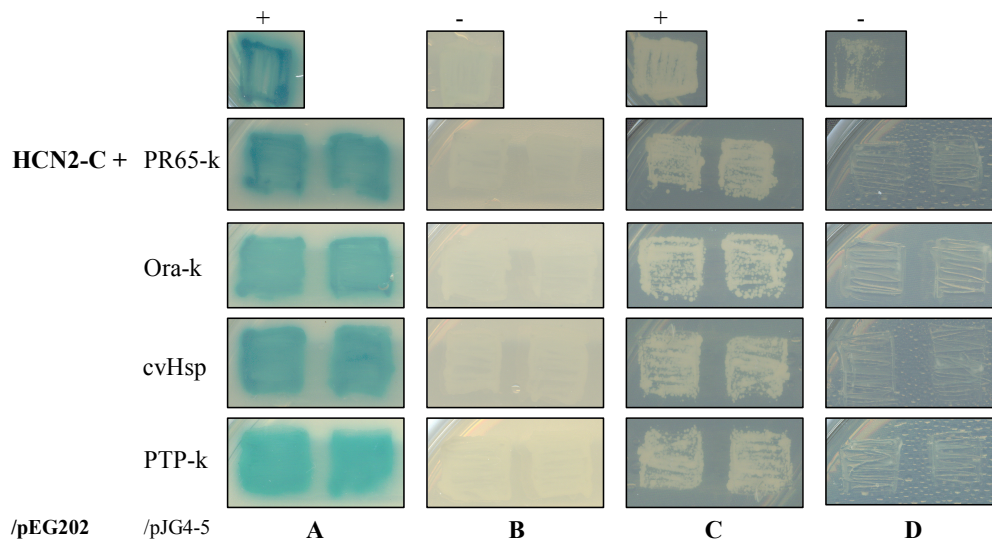


Abb. 3.3-3: Auswertung des Rescreen von mHCN2-C mit PR65-k, Ora-k, cvHsp und PTP-k

Aufsicht auf Hefeplatten mit je zwei unabhängigen Hefeklonen, die die Plasmide mHCN2-C/pEG202, x/pJG4-5 und pSH18-34 enthalten. Oben sind je eine Positiv- und eine Negativkontrolle gezeigt. Die vier Spalten geben die vier Bedingungen wider: Gal/Raff/X-Gal -Ura, -His, -Trp (A), Glu/XGal -Ura, -His, -Trp (B), Gal/Raff -Ura, -His, -Trp, -Leu (C) und Glu -Ura, -His, -Trp, -Leu (D)

Mit dem Zwei-Hybrid-System konnten erste Hinweise darauf gewonnen werden, daß der C-Terminus des mHCN2 verschiedene Interaktionspartner hat. Nach diesen Versuchen zu urteilen, interagiert er mit der strukturellen α -Untereinheit der Proteinphosphatase 2A innerhalb einer 690bp-Region des C-Terminus. Einen weiteren potentiellen Interaktionspartner stellt das Protein Oracle/Cypher dar, dessen Interaktionsdomäne auf eine 423bp-Region am C-Terminus eingeschränkt werden konnte, in der die 3 LIM-Domänen lokalisiert sind. Auch für das kardiovaskuläre Heatshockprotein (cvHsp) und die Protein-Tyrosin-Phosphatase (rPTP TD14) deuteten die Ergebnisse des Zwei-Hybrid-Systems auf eine Interaktion mit mHCN2-C hin.

Eine erste Einschränkung des interagierenden Bereichs von mHCN2 gelang durch Zwei-Hybrid-Versuche mit mHCN2-C2 als Köderprotein und PR65-k, Ora-k, cvHsp und PTP-k als Beuteprotein. Aus Abb. 3.3-4 konnte man schließen, daß keines der vier im Bibliotheksscreen identifizierten Proteine mit dem mHCN2-C2 Köderprotein interagierte. In allen Fällen ist keine Blaufärbung der Hefezellen auf den Gal/Raff/X-Gal -Ura -His -Trp-Platten (A) und kein Wachstum auf den Gal-Raff -Ura -His -Trp -Leu-Platten (C) zu sehen. Die leicht bläuliche Färbung von Ora-k, cvHsp und PTP-k mit mHCN2-C2 ist nicht als positiv zu werten, da sie deutlich schwächer ist als die Positivkontrolle und das entsprechende Wachstum auf der Gal/Raff -Ura -His -Trp -Leu-Platte fehlt. Einzelne Klone auf diesen Platten sind ebenfalls nicht zu werten, da es sich dabei um Hefekolonien handelt, die auf zugrunde gegangenen Zellen wachsen, was nach längerer Inkubationszeit auftreten kann.

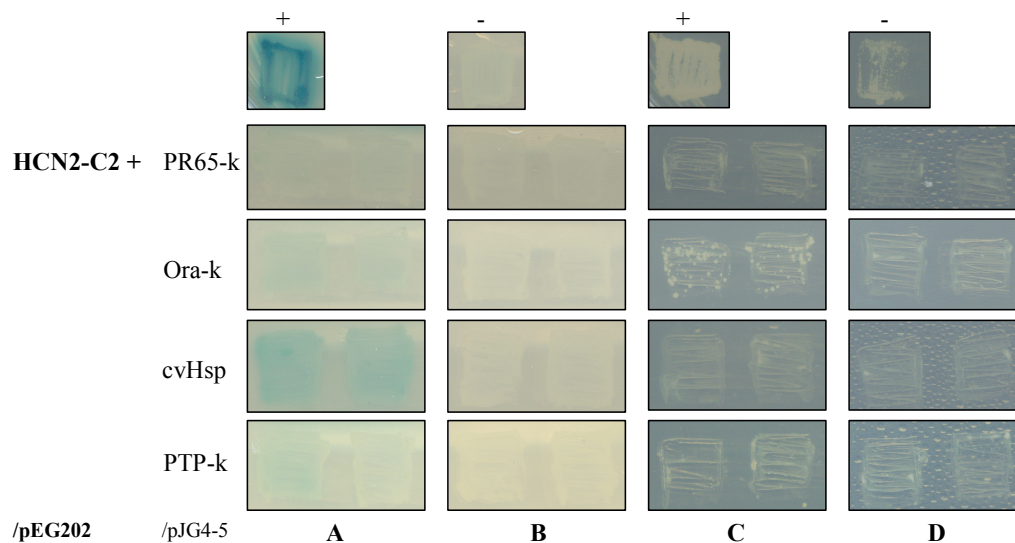


Abb. 3.3-4: Auswertung der Galaktoseabhängigkeit von mHCN2-C2 mit PR65-k, Ora-k, cvHsp, PTP-k

Aufsicht auf Hefeplatten mit je zwei unabhängigen Hefeklonen, die die angegebenen Plasmide sowie das *lacZ*-Reporterplasmid pSH18-34 enthalten. Oben sind jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle abgebildet. Die vier Spalten entsprechen den vier verschiedenen Bedingungen: Gal/Raff/X-Gal –Ura, –His, –Trp (A), Glu/X-Gal –Ura, –His, –Trp (B), Gal/Raff –Ura, –His, –Trp, –Leu (C) und Glu –Ura, –His, –Trp, –Leu (D)

In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die interagierende Region des mHCN2 offenbar nicht im absoluten C-Terminus liegt, sondern sich im Bereich des C-linkers und der CNBD befinden muß.

Ein identisches Ergebnis wurde mit den hHCN4-Konstrukten erzielt. Alle vier Proteine, die im Zwei-Hybrid-System als Interaktionspartner von mHCN2-C identifiziert werden konnten, interagierten auch mit dem hHCN4-C-Konstrukt. hHCN4-C2 und –C4 dagegen erwiesen sich als untauglich für dieses System, da sie die Transkription der Reportergene unspezifisch aktivierten (Hefebilder nicht gezeigt). Vermutlich liegt aber auch hier die Interaktion auf seiten des hHCN4 im Bereich des linkers und der CNBD, da hier die höchste Homologie zu mHCN2 vorhanden ist. Im Weiteren konzentrierte sich die Arbeit auf die Untersuchung der Interaktionen des mHCN2.

3.3.2 Ko-Immunpräzipitation

Die im Zwei-Hybrid-System auf genetischer Ebene identifizierten Interaktionen des mHCN2 C-Terminus mit den oben aufgeführten Proteinen sollten mit einer biochemischen Technik bestätigt werden, da das Zwei-Hybrid-System zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Für die Bestätigung sollten Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollten Konstrukte kloniert werden, die jeweils das gesamte Gen von PR65, Oracle und cvHsp umfassten. Mit geeigneten Primern, die Schnittstellen für die Klonierung enthielten, wurden die Gene aus cDNA amplifiziert. Zuvor wurde dafür RNA aus 4 BALB/c-Maus-Herzen (0,97g Gewebe) isoliert (2.10.1). Die Ausbeute betrug 1,6µg RNA/mg eingesetztem Gewebe. Anschließend wurde der erste Strang cDNA synthetisiert (2.10.2).

3.3.2.1 Klonierung von myc-Fusionsproteinen

Mit der einzelsträngigen cDNA als template wurden PCRs mit entsprechenden Primern durchgeführt, um die kompletten Gene der identifizierten Proteine zu amplifizieren.

Tab. 3.3-D: Übersicht über die verwendeten Primer zur Amplifikation der kompletten Gene aus cDNA

Gen	P _F	P _R	Länge PCR-Produkt	Vektor
PR65	HA29F	HA30R	1780bp	pcDNA3.1mycHis-A
Oracle	HA13F	HA14R	2193bp	pcDNA3.1mycHis-A
cvHsp	HA39F	HA40R	580bp	pcDNA3.1mycHis-B

Die Vorwärtsprimer (P_F) wurden dabei so gewählt, daß eine EcoR I-Schnittstelle, gefolgt von der Kozak-Sequenz vor dem Start-Codon (GAA TTC GCC GCC ACC ATG) enthalten war. Im Rückwärtsprimer (P_R) wurden die Stop-Codons zerstört, damit C-terminal der im Vektor pcDNA3.1mycHis enthaltene myc-tag (in drei Leserahmen, Versionen A, B, C) abgeschrieben wurde. Anstelle des Stopcodons wurde eine Xho I-Schnittstelle eingefügt, über die eine EcoR I/Xho I-Klonierung in den geschnittenen und dephosphorylierten Vektor möglich wurde. Da die rPTP TD14 entsprechende Sequenz aus der Maus nicht bekannt ist, wurde in diesem Fall das Fragment PTP-k für einen geplanten GST-Pulldown in den Vektor pET41a kloniert. Die Konstrukte wurden in *E. coli* transformiert, isoliert und sequenziert. Die Plasmide, die ein richtiges Insert enthielten, wurden für die weitere Verwendung im großen Maßstab vermehrt und aufgereinigt (2.3.2).

3.3.2.2 Ko-Immunpräzipitation von mHCN2 und PR65 sowie mHCN2 und Oracle

Für die Ko-Immunpräzipitation wurden zunächst mHCN2/pcDNA3 und PR65/pcDNA3.1mycHisA in HEK293 Zellen heterolog koexprimiert. Nach der Lyse der Zellen wurde das Lysat über Nacht bei 4°C mit ProteinA-Sepharose-beads und einem anti-myc-AK (bzw. HCN2-Antiserum) inkubiert, gefolgt von einer Detektion nach Western Blot mit HCN2-Antiserum (bzw. anti-myc-AK). Die Interaktion von PR65myc und mHCN2 konnte mittels Ko-Immunpräzipitation bestätigt werden (Abb. 3.3-5, linke Spur). Die Koexpression und Ko-Immunpräzipitation von mHCN2 und hHCN4-myc diente als Positivkontrolle (Much *et al.*, 2003) (Abb. 3.3-5, Mitte). Zum Größenvergleich wurde nicht ko-immunpräzipitiertes mHCN2-Lysat aufgetragen (Abb. 3.3-5, rechte Spur).

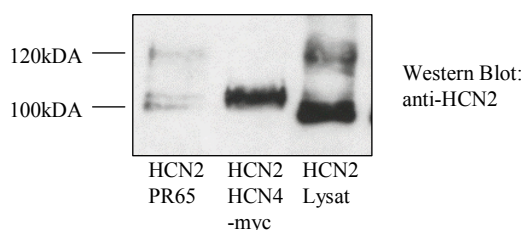


Abb. 3.3-5: Ko-Immunpräzipitation von PR65 und mHCN2

Western Blot nach Ko-Immunpräzipitation von mHCN2 und PR65myc aus HEK293-Zelllysaten. Fällung mit anti-myc-AK, Nachweis mit HCN2-Antiserum. Als Größenvergleich wurde nicht gefälltes HCN2-Lysat aufgetragen.

Western Blot: anti-myc-AK

Western Blot: anti-myc-AK

HCN2 PR65 HCN2 HCN4-myc

DNA: HCN2 PR65 HCN2 PR65 PR65 PR65 PR65 PR65 HCN2 HCN4-myc

gefällt mit: HCN2 Anti-Serum anti-CNG4 AK Anti-Serum HCN2 Anti-Serum HCN2 Anti-Serum HCN2 Anti-Serum

Western Blots nach Ko-Immunpräzipitationen von mHCN2 und PR65myc aus HEK293-Zelllysaten. Fällung mit HCN2-Antiserum, Nachweis mit anti-myc-AK. Als Größenvergleich wurde nicht gefälltes PR65myc-Lysat aufgetragen.

Western Blot:
anti-HCN2

120kDa —
100kDa —

HCN2 Ora HCN2 HCN4 -myc HCN2 Lysat

Western Blot nach Ko-Immunpräzipitation von mHCN2 und Ora-myc aus HEK293-Zelllysaten. Fällung mit anti-myc-AK, Nachweis mit HCN2-Antiserum. Als Größenvergleich wurde nicht gefälltes mHCN2-Lysat aufgetragen.

Somit konnte für mHCN2 und PR65 sowie für mHCN2 und Oracle die im Zwei-Hybrid-Ansatz gefundene Interaktion bestätigt werden. Für cvHsp ließ sich in diesem Ansatz die Interaktion nicht zeigen.

3.3.3 c-Src als Interaktionspartner

Als weiterer potentieller Interaktionspartner für mHCN2 wurde die zelluläre Src-Kinase (c-Src) untersucht. Sie war aus zwei Gründen interessant. Eigene Ergebnisse aus der Elektrophysiologie ergaben Hinweise auf eine Regulation des mHCN2 Kanals durch c-Src. Nach heterologer Koexpression von HCN2 und c-Src in HEK293 Zellen und Zugabe des spezifischen c-Src Inhibitors PP2 (Hanke *et al.*, 1996) konnte eine Verlangsamung der Aktivierung des HCN2-Stromes beobachtet werden. Gibt man ein inaktives Analogon des Inhibitors, PP3, zu, bleibt dieser Effekt aus. Die Verlangsamung kann auch durch die Expression einer inaktiven c-Src Mutante aufgehoben werden. Die Messung von mHCN2 und c-Src ohne Inhibitoren ergibt keinen Unterschied zum nativen mHCN2 Strom, was daran liegen kann, daß c-Src bereits endogen in den HEK293 Zellen exprimiert wird, und eine Überexpression keinen messbaren Effekt auf HCN2 hat. Aufgrund dieser starken Hinweise auf eine Interaktion zwischen mHCN2 und c-Src und den Ergebnissen von Santoro *et al.* (1997), die mit der SH3 Domäne der neuronalen Isoform der Src-Kinase in einem Zwei-Hybrid-Versuch als eine von drei Gruppen die HCN-Kanäle entdeckt hatten, wurde dieser Interaktion auf molekularer Ebene nachgegangen.

Die zelluläre Src-Kinase enthält verschiedene strukturelle Merkmale, vom einzigartigen N-Terminus über eine SH3- und eine SH2-Domäne, die katalytische Domäne bis hin zum regulatorischen, nicht katalytischen C-Terminus (Schema Abb. 3.3-8). Sie wird in allen höheren Eukaryoten und vielen Zelltypen exprimiert, doch ihre Regulation und physiologische Funktion in der Zelle sind noch nicht geklärt.

3.3.3.1 Klonierung der Konstrukte in Hefevektoren

Für die Untersuchung einer Interaktion zwischen mHCN2-C und der Src-Kinase wurden zwei neue Beuteproteine aus der Src-Kinase konstruiert. Ausgehend von c-Src/pRK5 (zur Verfügung gestellt von Z. Chen) wurden zwei verschiedene Konstrukte in den Vektor pJG4-5 kloniert: einmal die komplette DNA-Sequenz der Src-Kinase (1600bp) und einmal nur die Sequenz der SH3 Domäne (170bp) (Abb. 3.3-8). Für das c-Src-Konstrukt wurde das Gen mit den Primern HA66F/pRK5-R in einer PCR-Reaktion mit PremixG amplifiziert und in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor (Invitrogen) zwischenkloniert. Nachdem die Sequenz überprüft worden war, wurde in einem ersten Ansatz das Insert mit EcoR I und Sal I ausgeschnitten. Der Überhang von Sal I-geschnittenen Fragmenten ist zum XhoI-Überhang kompatibel (6.1). Allerdings ließ sich c-Src so nicht in den mit EcoR I und Xho I geöffneten und dephosphorylierten Vektor pJG4-5 ligieren. Deshalb wurde c-Src mit EcoR I aus dem TOPO-Vektor ausgeschnitten und in den nur EcoR I geschnittenen, mit CIP behandelten Vektor pJG4-5 kloniert. Danach wurde die richtige Orientierung des Inserts durch geeignete Restriktionsverdaus und Sequenzierung überprüft. Für das SH3-Konstrukt wurde der

entsprechende Teilbereich mittels PCR mit den Primern HA64F/HA65R amplifiziert und über die in die Primer eingefügten Schnittstellen von EcoR I und Xho I gerichtet in den geöffneten und dephosphorylierten Vektor pJG4-5 ligiert. Auch dieses Konstrukt wurde durch Sequenzierung überprüft.

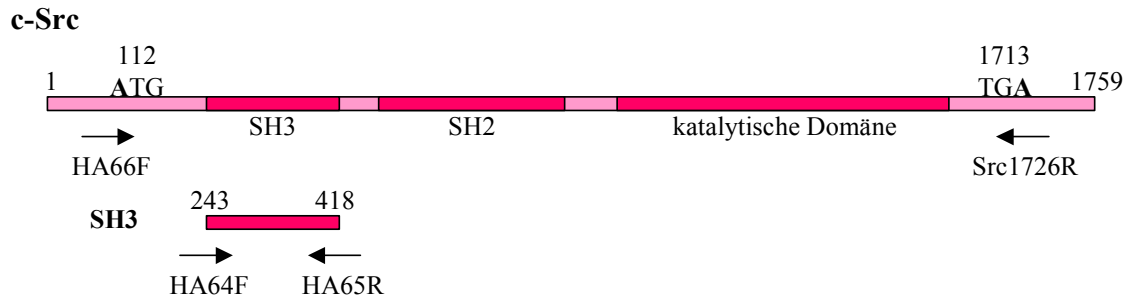


Abb. 3.3-8: schematische Darstellung der klonierten Regionen von c-Src und SH3

Die Abbildung zeigt ein stark vereinfachtes Schema des Gens für c-Src und verdeutlicht die Lage der SH3-Domäne relativ zum Gen (nicht maßstabsgetreu). Zur Klonierung verwendete Primer sind eingezeichnet (Pfeile). Die Zahlen beziehen sich auf Basenpaare. Strukturelle Besonderheiten sind eingezeichnet (SH3, SH2, katalytische Domäne).

3.3.3.2 Untersuchung der Interaktion mittels des Zwei-Hybrid-Systems

Nachdem die Konstrukte mHCN2-C, -C2 und -C4 im Vektor pEG202 zusammen mit entweder c-Src/pJG4-5 oder SH3/pJG4-5 und pSH18-34 in Hefezellen transformiert worden waren (2.11.8.3), wurden Klone gepickt und auf ihre Galaktose-Abhängigkeit getestet. Zusätzlich wurden auch die analogen Konstrukte des hHCN4 auf eine Interaktion mit c-Src untersucht. Abb. 3.3-9 zeigt einen Blick auf die Hefezellen auf vier verschiedenen Medien. In der oberen Hälfte der Abbildung ist zu sehen, daß c-Src nur mit mHCN2-C interagiert, da sich die Hefezellen der beiden anderen Ansätze auf der Gal/Raff/X-Gal -Ura -His -Trp-Platte nicht blau färben und schwächer auf Gal/Raff -Ura -His -Trp -Leu-Platten wachsen. In der unteren Hälfte handelt es sich um die Untersuchung der Interaktionen von c-Src mit verschiedenen C-terminalen Konstrukten des hHCN4. Aus dem Verhalten der Hefezellen konnte geschlossen werden, daß c-Src mit hHCN4-C interagiert. Über die Interaktion mit den Köderproteinen hHCN4-C2 und -C4 ist keine Aussage möglich, da diese die Transkription der Reportergene unspezifisch aktivieren: die Zellen färben sich blau (B) und wachsen (D) auf Glukose-haltigem Medium.

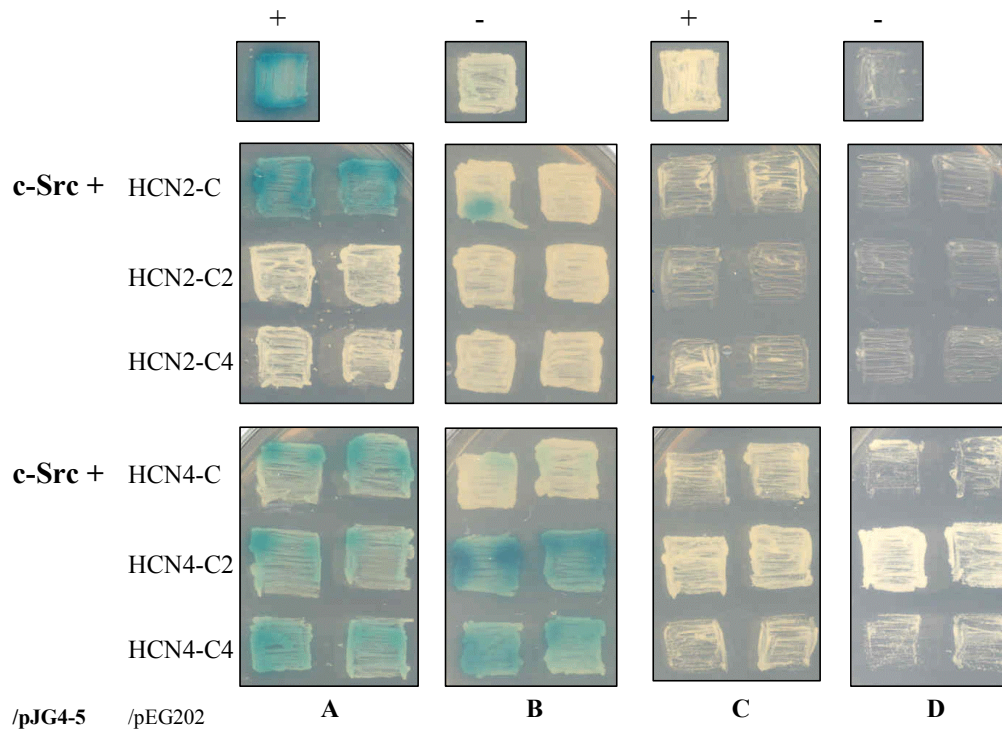


Abb. 3.3-9: Auswertung der Galaktose-Abhängigkeit von c-Src mit verschiedenen HCN-Konstrukten

Aufsicht auf Hefeplatten mit je zwei unabhängigen Hefeklonen, die die angegebenen Plasmide sowie das *lacZ*-Reporterplasmid pSH18-34 enthalten. Oben sind jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle abgebildet. Die vier Spalten entsprechen den vier verschiedenen Bedingungen: Gal/Raff/X-Gal –Ura, –His, –Trp (A), Glu/X-Gal –Ura, –His, –Trp (B), Gal/Raff –Ura, –His, –Trp, –Leu (C) und Glu –Ura, –His, –Trp, –Leu (D)

Aus diesem Versuch geht hervor, daß nur mHCN2-C mit c-Src interagiert. Da mHCN2-C2 und –C4 nicht interagieren, muß die Interaktionsdomäne bei mHCN2 im Bereich des C-linkers und der CNBD liegen. Für hHCN4 kann man nur sagen, daß der komplette C-Terminus mit der Src-Kinase interagiert, die anderen beiden Köder-Konstrukte aktivieren die Transkription der β -Galaktosidase bzw. des *Leu2*-Gens unspezifisch.

Um zu untersuchen, ob die Interaktionsdomäne auf Seiten von c-Src in der SH3-Region liegt, wurde derselbe Versuch mit SH3/pJG4-5 durchgeführt. Abb. 3.3-10 zeigt eine deutliche Interaktion von SH3 mit mHCN2-C, was an der Blaufärbung der Zellen auf der Gal/Raff/X-Gal –Ura –His –Trp-Platte zu erkennen ist. Daß in diesem Fall im Gegensatz dazu kein Wachstum auf der Gal/Raff –Ura –His –Trp –Leu-Platte zu erkennen ist, liegt an der zu kurzen Inkubationszeit. Für SH3 mit hHCN4 C-terminalen Konstrukten ist die Auswertung wieder eindeutig. Eine Interaktion findet statt zwischen SH3 und hHCN4-C. Für hHCN4-C2 und –C4 ist aufgrund der unspezifischen Transkriptionsaktivierung keine Auswertung möglich.

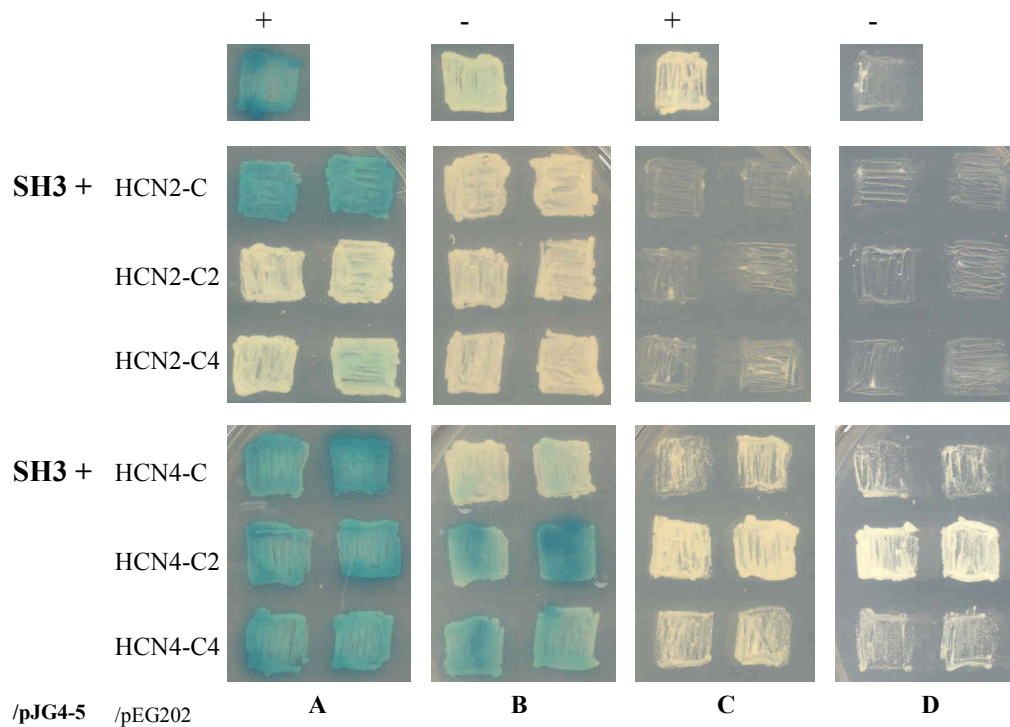


Abb. 3.3-10: Auswertung der Galaktose-Abhängigkeit von SH3 mit verschiedenen HCN-Konstrukten

Aufsicht auf Hefeplatten mit je zwei unabhängigen Hefeklonen, die die angegebenen Plasmide sowie das *lacZ*-Reporterplasmid pSH18-34 enthalten. Oben sind jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle abgebildet. Die vier Spalten entsprechen den vier verschiedenen Bedingungen: Gal/Raff/X-Gal –Ura, –His, –Trp (A), Glu/X-Gal –Ura, –His, –Trp (B), Gal/Raff –Ura, –His, –Trp, –Leu (C) und Glu –Ura, –His, –Trp, –Leu (D)

Mit diesem Versuch konnte bestätigt werden, daß die Interaktionsregion im mHCN2 im Bereich des C-linkers und der CNBD liegen muß, sowie daß die Interaktionsregion in der Src-Kinase im Bereich der SH3 Domäne liegt, für die die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen beschrieben wurde (Mayer *et al.*, 2001). Für den hHCN4 konnte wiederum nur das hHCN4-C-Köderprotein ausgewertet werden, das auch mit der SH3 Domäne von c-Src interagiert. Wahrscheinlich liegt aber auch beim hHCN4 die interagierende Region im Bereich des C-linkers und der CNBD, da hier eine deutlich höhere Homologie zwischen den HCN-Isoformen festzustellen ist als im weiteren Verlauf des C-Terminus.

3.3.3.3 GST-Pulldown von SH3-GST und mHCN2

Auch hier sollte das Ergebnis aus dem Zwei-Hybrid-Versuch mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden. Dazu wurde die SH3 Domäne der Src-Kinase „in frame“ über die EcoR I und Xho I-Schnittstellen in den dephosphorylierten Vektor pET41a umklontiert, so daß ein Protein exprimiert wurde, das am N-Terminus den GST-Anteil, gefolgt von einem His-tag trägt und am C-Terminus den SH3-Anteil. Dieses Fusionsprotein hat eine errechnete Größe von 42kDa. Nachdem das GST-SH3-Protein in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und isoliert worden war, wurde es über Glutathion-Sepharose beads aufgereinigt (2.16.3). Die SH3-GST-beads wurden anschließend mit einem Lysat von mHCN2-exprimierenden HEK293 Zellen inkubiert, wobei sich im Falle einer Interaktion der mHCN2-Kanal an die SH3-GST-beads binden und sich durch Zentrifugation vom restlichen Lysat abtrennen lassen sollte. Die beads,

die die Komplexe trugen, wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen, und nach Western Blot wurde mittels Immundetektion der Nachweis geführt. Abb. 3.3-11 (A) zeigt eine deutliche Bande von mHCN2 in der dritten Spur neben dem mHCN2-Lysat, welches als Größenvergleich aufgetragen wurde. Die zwei leeren Spuren rechts daneben zeigen, daß es sich dabei um eine spezifische Interaktion handelt.

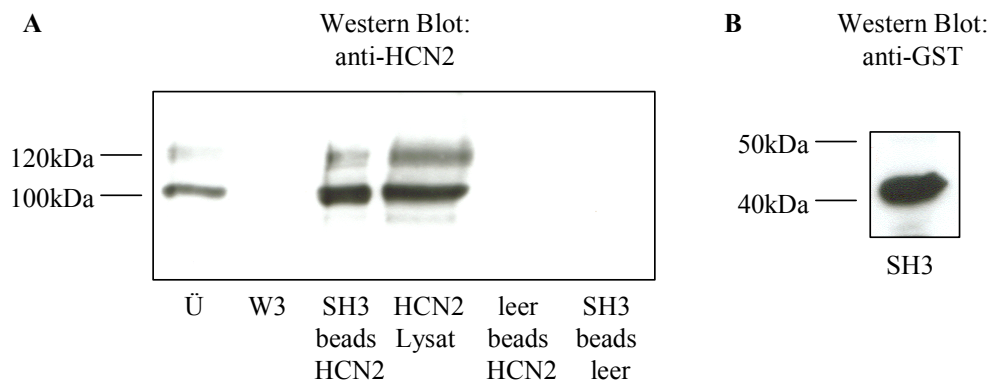


Abb. 3.3-11: GST-Pulldown mit GST-SH3 und mHCN2

(A) Western Blot nach GST Pulldown von SH3 und mHCN2 aus HEK293-Zelllysaten. Zu sehen sind der Überstand nach Inkubation (Ü), der Überstand nach einem Waschschrift (W3), die SH3-GST-beads mit gefälltem mHCN2, mHCN2-HEK293-Lysat als Größenvergleich sowie zwei Negativ-Kontrollen: leere beads mit mHCN2-Lysat inkubiert und SH3-GST-beads mit Leerzelllysate inkubiert.

(B) Western Blot mit GST-SH3 beads. Nachweis, daß das Fusionsprotein an die beads gebunden hat.

Auch im GST Pulldown Versuch konnte gezeigt werden, daß zwischen der SH3 Domäne der Src-Kinase und mHCN2 eine Interaktion besteht.

3.3.4 Klonierung weiterer Köderproteine

Nachdem im GST Pulldown nachgewiesen wurde, daß SH3 und mHCN2 interagieren, und das Zwei-Hybrid-System Hinweise ergab, daß der Bereich der Interaktion in der Region des linkers und der CNBD des mHCN2 zu liegen scheint, sollten weitere Versuche dazu durchgeführt werden.

Es wurden drei neue Konstrukte des mHCN2 mittels PCR und über EcoR I und Xho I in den mit CIP behandelten Vektor pJG4-5 kloniert (Abb.3.3-12).

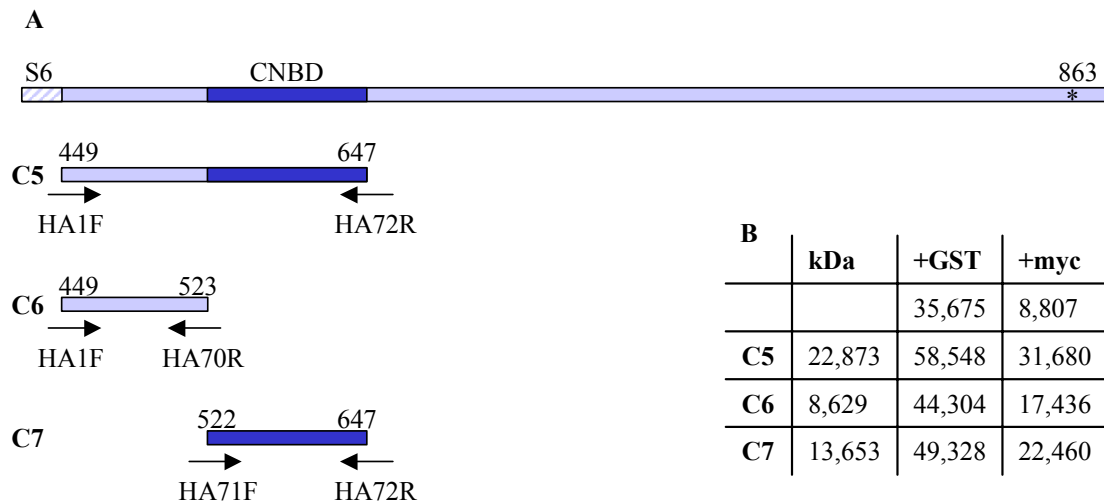


Abb. 3.3-12: schematische Darstellung der Konstrukte mHCN2-C5, -C6 und -C7 im Vektor pEG202

(A) Die Abbildung zeigt ein stark vereinfachtes Schema des mHCN2 C-Terminus und gibt einen Überblick über die relative Lage der neu klonierten C-terminalen mHCN2-Konstrukte. Für die Klonierung eingesetzte Primer sind eingezeichnet (Pfeile). Die Zahlen beziehen sich auf Aminosäurereste.

(B) Die Tabelle gibt die Größen der entstandenen (Fusions-) Proteine wider, die später in GST-Pulldown Experimente eingesetzt wurden.

3.3.4.1 Untersuchung der Interaktionen mittels des Zwei-Hybrid-Systems

Um einen ersten Überblick über den interagierenden Bereich zu bekommen, wurden nach der Klonierung der drei Konstrukte in den Hefe-Vektor pEG202 folgende Konstrukte in pJG4-5 damit auf eine Interaktion getestet: c-Src und SH3, später PR65-k, Ora-k, cvHsp und PTP-k.

Abb. 3.3-13 zeigt den Versuch, in dem die neuen Köderproteine mHCN2-C5, -C6 und -C7 mit den Beuteproteinen c-Src und SH3 auf Interaktionen untersucht wurden. Für die Kombination c-Src bzw. SH3 mit mHCN2-C5 konnte eine Interaktion gezeigt werden, was durch die Blaufärbung der Hefezellen auf den Gal-Raff/X-Gal –Ura –His –Trp-Platten (A), der ausbleibenden Färbung auf den Glu/X-Gal –Ura –His –Trp-Platten (B), dem Wachstum auf den Gal-Raff –Ura –His –Trp –Leu-Platten (C) und dem fehlenden bzw. wesentlich schwächeren Wachstum auf den Glu –Ura –His –Trp –Leu-Platten (D) zu sehen war. Für die Kombination von c-Src bzw. SH3 mit mHCN2-C6 ist in beiden Fällen keine Aussage möglich, da mHCN2-C6 die Transkription der Reportergene unspezifisch aktivierte (wie auch in den parallel durchgeführten Vorversuchen). Für die Kombination c-Src bzw. SH3 mit mHCN2-C7 konnte aufgrund der ausbleibenden Blaufärbung auf den Gal-Raff/X-Gal –Ura –His –Trp-Platten (A) und des fehlenden Wachstums auf den Gal-Raff –Ura –His –Trp –Leu-Platten (C) eine Interaktion ausgeschlossen werden.

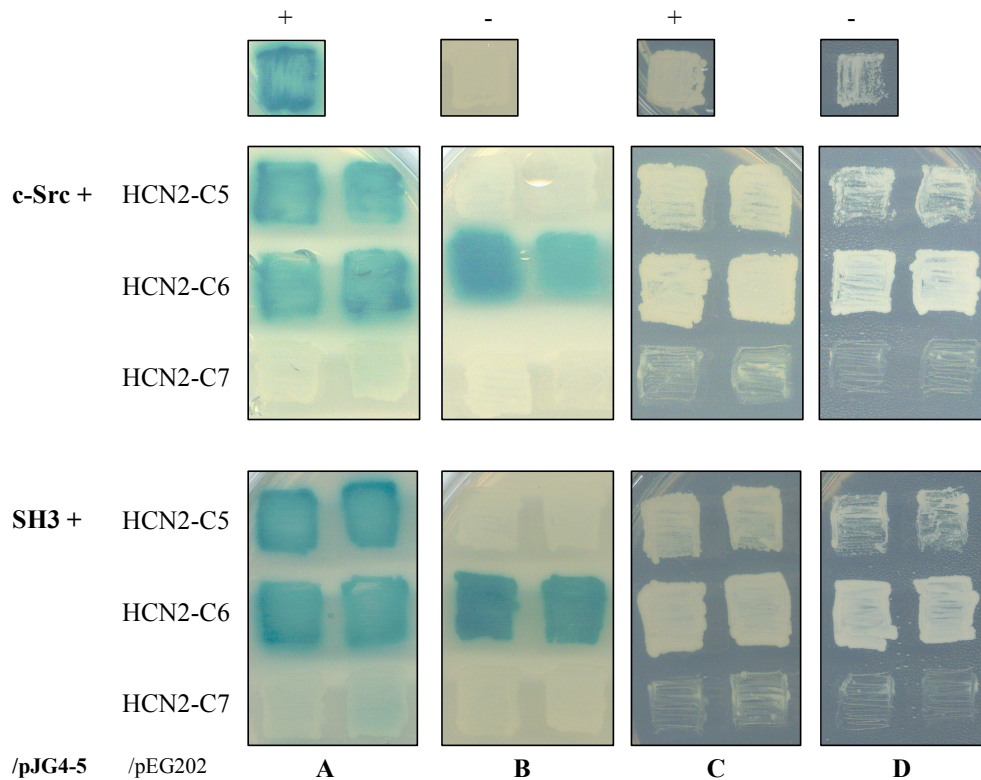


Abb. 3.3-13: Auswertung der Galaktose-Abhängigkeit von c-Src und SH3 mit verschiedenen HCN-Konstrukten

Aufsicht auf Hefeplatten mit je zwei unabhängigen Hefeklonen, die die angegebenen Plasmide sowie das *lacZ*-Reporterplasmid pSH18-34 enthalten. Oben sind jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle abgebildet. Die vier Spalten entsprechen den vier verschiedenen Bedingungen: Gal/Raff/X-Gal -Ura, -His, -Trp (A), Glu/X-Gal -Ura, -His, -Trp (B), Gal/Raff -Ura, -His, -Trp, -Leu (C) und Glu -Ura, -His, -Trp, -Leu (D)

Aus diesen Versuchen kann man schließen, daß die Interaktionsregion im Bereich des C-linkers und der CNBD liegt, da mHCN2-C5 in beiden Fällen positiv reagiert. Allerdings konnte der Bereich nicht eindeutig weiter eingegrenzt werden, da sich das Köderprotein mHCN2-C6 als unbrauchbar erwies. Allerdings legte die negative Reaktion des Köders mHCN2-C7 die Vermutung nahe, daß der Bereich des C-linkers an der Interaktion beteiligt ist.

Für die im Hefescreen identifizierten Proteine wurde dieser Versuch nur noch mit mHCN2-C5 und-C7 durchgeführt, da sich gezeigt hatte, daß mHCN2-C6 die Transkription unspezifisch aktivierte. Auch aus den Bildern in Abb. 3.3-14 kann anhand des Verhaltens der Hefezellen auf den verschiedenen Kulturbedingungen auf eine Interaktion aller vier Beuteproteine mit mHCN2-C5 geschlossen werden (Blaufärbung auf den Gal-Raff/X-Gal -Ura -His -Trp-Platten (A), Wachstum auf den Gal-Raff -Ura -His -Trp -Leu-Platten (C)), wohingegen eine Interaktion mit mHCN2-C7 auszuschließen ist.

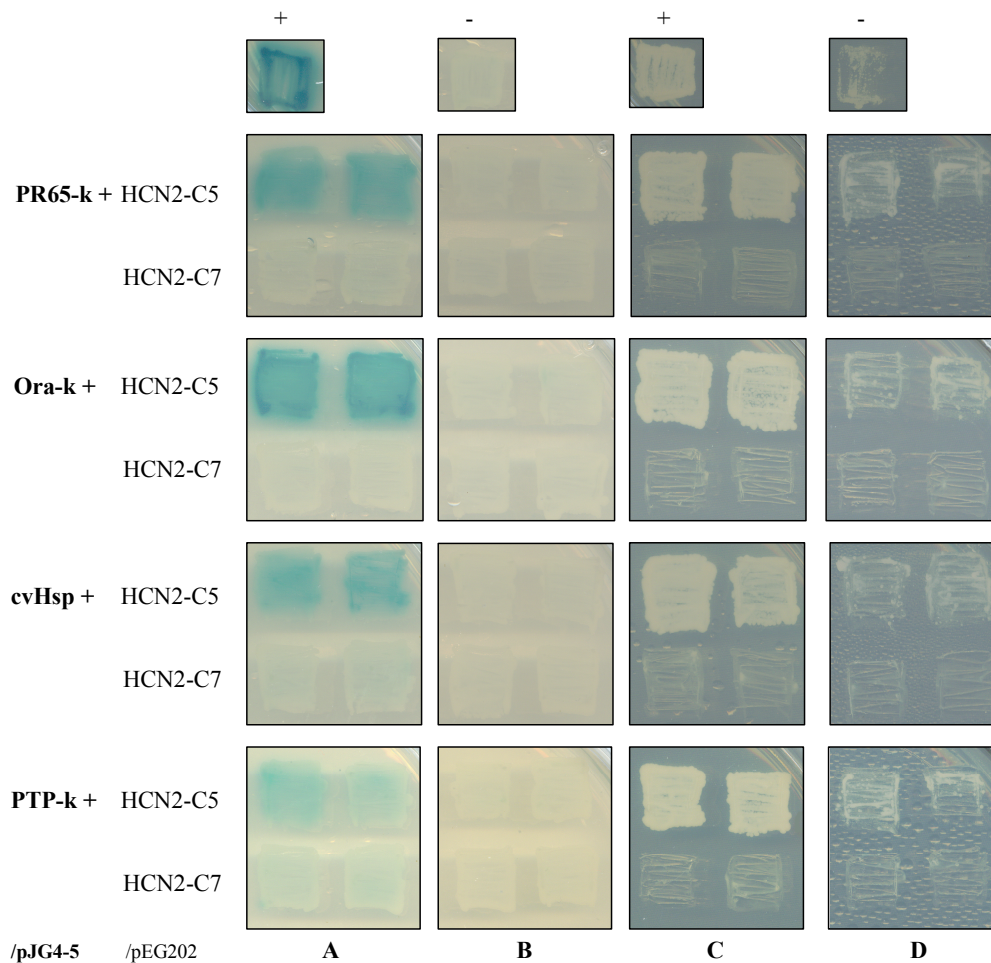


Abb. 3.3-14: Auswertung der Galaktose-Abhängigkeit von PR65-k, Ora-k, cvHsp und PTP-k mit verschiedenen HCN-Konstrukten

Aufsicht auf Hefeplatten mit je zwei unabhängigen Hefeklonen, die die angegebenen Plasmide sowie das *lacZ*-Reporterplasmid pSH18-34 enthalten. Oben sind jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle abgebildet. Die vier Spalten entsprechen den vier verschiedenen Bedingungen: Gal/Raff/X-Gal -Ura, -His, -Trp (A), Glu/X-Gal -Ura, -His, -Trp (B), Gal/Raff -Ura, -His, -Trp, -Leu (C) und Glu -Ura, -His, -Trp, -Leu (D)

Für alle vier Proteinfragmente ist eine Interaktion mit dem Köderprotein mHCN2-C5 nachweisbar, während mHCN2-C7 in allen vier Fällen negativ reagiert, was den Schluß auf eine Beteiligung des C-linkers von mHCN2 an der Interaktion nahelegt.

3.3.4.2 GST-Pulldown von mHCN2-C5, -C6 und -C7 mit c-Src bzw. SH3

Um Klarheit bezüglich der Interaktion von mHCN2-C6 und c-Src bzw. SH3 zu schaffen, wurden mHCN2-C5 (als Positivkontrolle) und -C6 in den Vektor pET41a umklontiert. Die in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen exprimierten GST-Fusionsproteine wurden mit Hilfe von Glutathion-Sepharose beads aufgereinigt und anschließend mit Lysaten aus HEK293 Zellen inkubiert, die c-Src entweder aus dem Vektor pRK5 oder pIRES2-EGFP (clontech) exprimierten, um eventuelle Probleme durch unterschiedliche Expressionslevel zu vermeiden. In Vorversuchen konnten keine Unterschiede festgestellt werden (nicht gezeigt). In Abb. 3.3-15 ist deutlich zu sehen, daß sowohl mit mHCN2-C5 (linke Hälfte, dritte Spur) als auch mit

–C6 (rechte Seite, dritte Spur) die Src-Kinase gefällt werden konnte, allerdings wird die Spezifität durch schwächere Banden in zwei der Negativkontrollen (Spuren 5 und 6) in Frage gestellt.

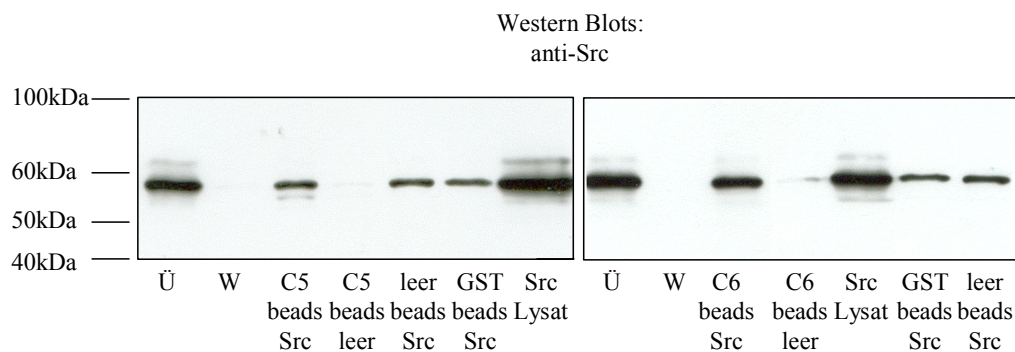


Abb. 3.3-15: GST-Pulldown mit mHCN2-C5-GST/-C6-GST und c-Src

Western Blot nach GST Pulldown von mHCN2-C5-GST (linke Abbildung) bzw. -C6-GST (rechte Abbildung) und c-Src aus HEK293-Zelllysaten in 1xPBS. Zu sehen sind der Überstand nach Inkubation (Ü), der Überstand nach einem Waschschritt (W), die C5/C6-GST-beads mit gefälltem c-Src, c-Src-Lysat als Größenvergleich sowie drei Negativ-Kontrollen: C5/C6-GST-beads mit Leerzelllysate, leere beads mit c-Src-Lysat und GST-beads mit c-Src-Lysat inkubiert.

Eventuell liegt dem ein Ungleichgewicht des Größenverhältnisses zwischen dem GST- und dem mHCN2-Anteil des Fusionsproteins (35kDa GST und 8kDa C6) zugrunde. Auch unter stringenteren Bedingungen mit höheren Salzkonzentrationen (bis 300mM KCl im AM-Puffer) waren die Banden in den Spuren der Negativkontrollen noch detektierbar.

Um dieses Problem zu umgehen, wurden mHCN2-C5, –C6 und –C7 (mit Zwischenklonierung in pET41a, siehe oben) über die BamH I und Xho I Schnittstellen in den bakteriellen Expressionsvektor pRSET-A umklont. pRSET-A trägt N-terminal zum Insert die Sequenz für einen His-tag. Da aber auch die GST-Fusionsproteine einen His-tag besitzen, wurde über Primer-Annealing (HAMyc-F/HAMyc-R) C-terminal zwischen die Pst I- und Hind III–Schnittstellen ein myc-tag im entsprechenden Leserahmen eingefügt (Abb. 3.3-16).

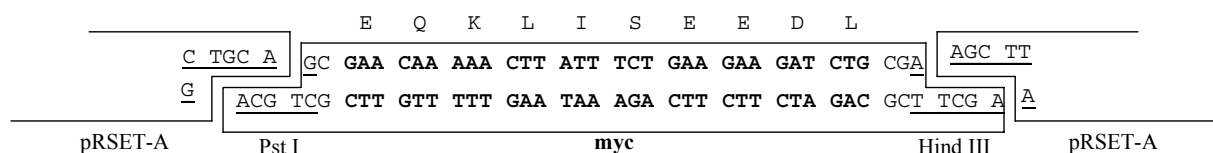


Abb. 3.3-16: schematische Darstellung des myc-tags

Die Abbildung zeigt ein stark vereinfachtes Schema des myc-tags sowie die Enden des Vektors, in den der myc-tag eingefügt wurde. Fett geschriebene Buchstaben kennzeichnen den myc-tag, oberhalb ist die Aminosäuresequenz angegeben. Unterstrichene Buchstaben kennzeichnen die Sequenz der Schnittstellen.

Somit konnte ein GST-Pulldown mit SH3-GST und mHCN2-C5myc, –C6myc und –C7myc (Schema siehe Abb. 3.3-12) aus bakteriellen Lysaten (*E. coli* BL21 (DE3)) durchgeführt werden. Abb. 3.3-17 zeigt drei Western Blots nach Immunodetektion mit anti-myc-AK. Die Banden in der jeweils dritten und sechsten Spur zeigen die Interaktion zwischen SH3-GST

und mHCN2-C5myc (A), SH3-GST und mHCN2-C6myc (B) sowie SH3 und mHCN2-C7myc (C).

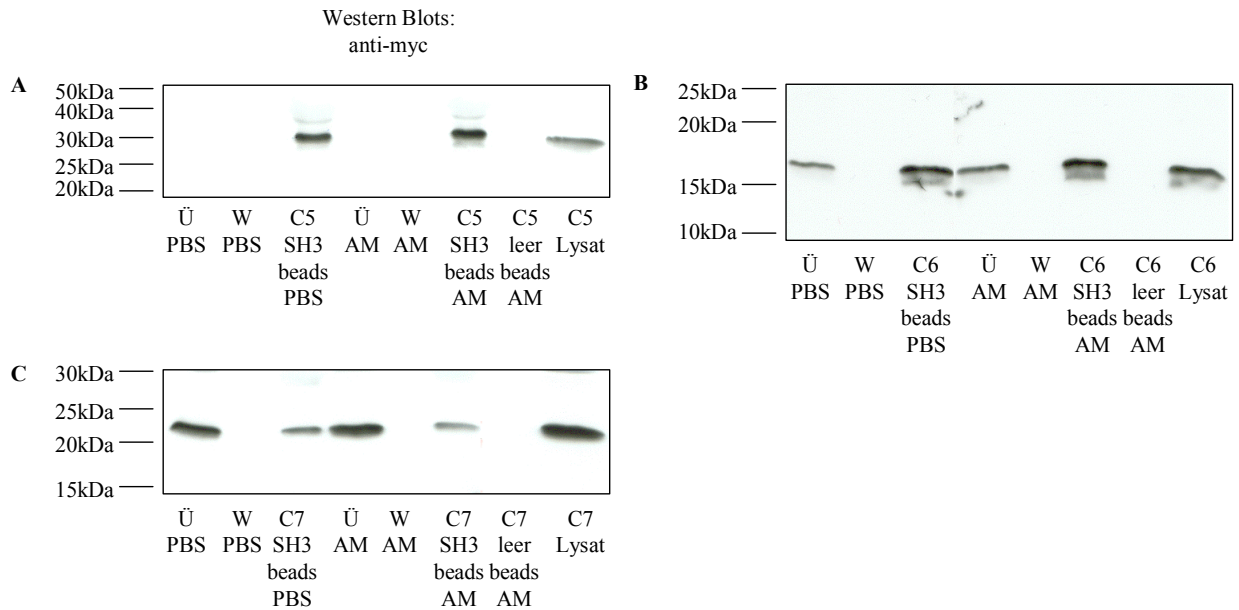


Abb. 3.3-17: GST-Pulldown mit SH3-GST und mHCN2-C5myc, -C6myc und -C7myc

Western Blot nach GST-Pulldown von SH3-GST und mHCN2-C5myc (A), -C6myc (B) und -C7myc (C). Zu sehen sind der Überstand nach Inkubation (Ü), der Überstand nach einem Waschschriff (W), die SH3-GST-beads mit gefälltem mHCN2-C5/C6/C7myc in je zwei verschiedenen Puffern (PBS und AM-50), C5/C6/C7myc-Lysate als Größenvergleich sowie als Negativkontrolle leere beads mit C5/C6/C7myc-Lysat inkubiert. Nicht gezeigt sind leere PBS-Negativkontrollen.

Mit diesen Blots konnte gezeigt werden, daß alle drei Konstrukte mHCN2-C5, -C6 und -C7 im GST-Pulldown Versuch mit der SH3 Domäne der Src-Kinase interagieren. Je nach Konzentration des Lysates sind in den Überständen mehr oder weniger starke Banden zu sehen.

Um einen Hinweis auf die Bindungsstelle des mHCN2 zu finden, wurden beschriebene Interaktionssequenzen von SH3 mit mHCN2-C5 verglichen. Das klassische prolinreiche Motiv mit der Konsensussequenz RLPXXP ist in mHCN2-C und -C5 nicht vorhanden. In letzter Zeit wurden weitere Sequenzen beschrieben, die mit SH3 interagieren können. Ein Beispiel sind hEAT-2 und hSAP, deren konservierte Aminosäuren, die mit SH3 interagieren, in mHCN2-C5 nicht gefunden werden konnten (Chan *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel ist die zytoplasmatische Domäne des β 3-Integrins (Arias-Salgado *et al.*, 2003). Ein Sequenzvergleich des Teilstücks des β 3-Integrins mit mHCN2-C5 ergab eine gewisse Homologie. Besonders unter Berücksichtigung der Strukturen (Ulmer *et al.*, 2001; Zagotta *et al.*, 2003) erscheint ein gemeinsames Bindungsmotiv für c-Src wahrscheinlich (Abb. 3.3-18).

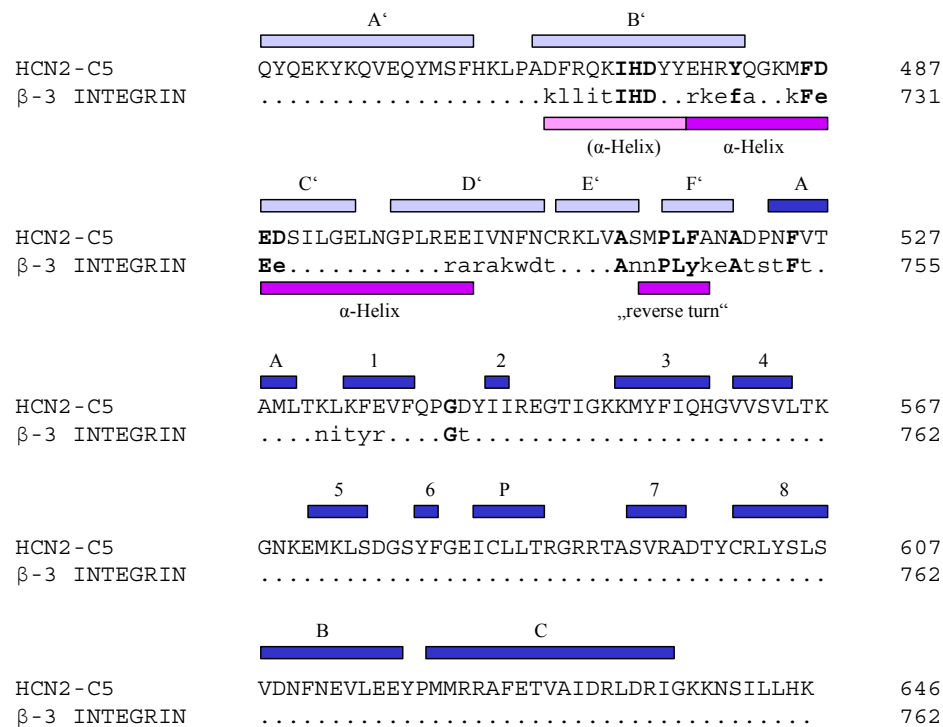


Abb. 3.3-18: Sequenzvergleich zwischen mHCN2-C5 und dem zytoplasmatischen Bereich des β3-Integrins

Die Punkte geben Lücken an, die eingefügt wurden, um eine bestmögliche Übereinstimmung zu erzielen. Fettgeschriebene Großbuchstaben stehen für identische Aminosäurereste, fettgeschriebene Kleinbuchstaben stehen für Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften, Kleinbuchstaben kennzeichnen abweichende Aminosäurereste. Die Zahlen beziehen sich auf die Position der Aminosäuren innerhalb des gesamten Proteins. Die α-Helices des C-linkers sind durch hellblaue Balken gekennzeichnet (A'-F'), die dunkelblauen Balken kennzeichnen die CNBD, deren α-Helices durch Buchstaben, die β-Faltblätter durch Zahlen benannt sind. Die rosa Balken kennzeichnen strukturelle Merkmale des β3-Integrins (siehe Diskussion).

Ein weiteres Mal kamen die mHCN2-C5myc, -C6myc und -C7myc-Konstrukte (Schema siehe Abb. 3.3-12) zum Einsatz, um auch für PR65-k, das über die EcoR I und Xho I Schnittstellen in den GST-Vektor pET41a kloniert worden war, die Frage zu klären, in welcher Region die Interaktion stattfindet. Negativkontrollen wurden nicht abgebildet, da im GST-Pulldown mit SH3-GST schon gezeigt worden war, daß mHCN2-C5myc, -C6myc und -C7myc nicht unspezifisch an leere beads binden. Das Ergebnis ist in Abb. 3.3-19 zu sehen. Jeder Blot zeigt in der ersten Spur die aufgetragenen PR65-k-GST-beads mit nachgewiesenem gefälltem mHCN2-C5/C6/C7myc-Protein, während in der zweiten Spur ungefälltes mHCN2-C5/C6/C7myc-Lysat als Größenvergleich zu sehen ist. Die unterschiedliche Stärke der Banden ist entweder auf unterschiedlich starke Expression der Proteine oder auf verschieden starke Interaktionen zurückzuführen.

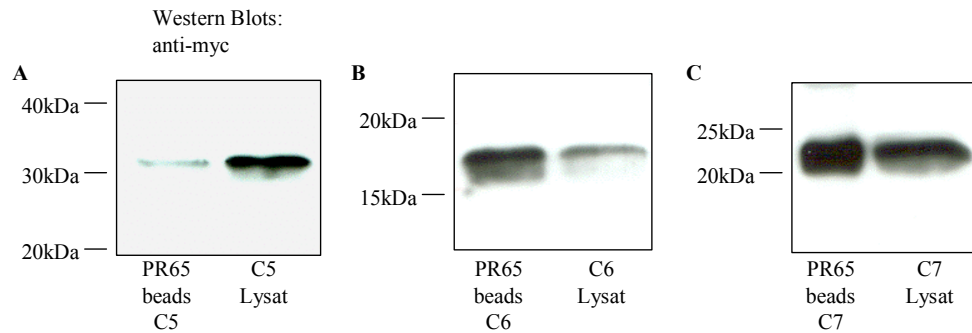


Abb. 3.3-19: GST-Pulldown von PR65-k-GST und mHCN2-C5myc, -C6myc und -C7myc

Western Blot nach GST-Pulldown von PR65-k-GST und mHCN2-C5myc (A), -C6myc (B) und -C7myc (C). Zu sehen sind jeweils die PR65-k-GST-beads mit gefällttem mHCN2-C5myc/C6myc/C7myc neben dem jeweiligen Lysat zum Größenvergleich.

Im GST-Pulldown konnte gezeigt werden, daß auch für die Interaktion zwischen PR65 und dem mHCN2-Kanal gilt, daß die potentielle Interaktionsregion des mHCN2 im Bereich des C-linkers und der CNBD liegt. Der GST-Pulldown mit cvHsp-GST oder PTP-k-GST und mHCN2 konnte aufgrund zu niedriger Expressionsraten des Fusionsproteins nicht ausgewertet werden.

Um zu untersuchen, ob es ein konserviertes Bindungsmotiv für PR65 gibt, das auch in mHCN2-C5 auftritt, wurde dessen Sequenz auf Aminosäuren untersucht, die bekannterweise mit PR65 eine Interaktion eingehen können. Hierbei handelte es sich unter anderem um ein Motiv aus sechs Aminosäuren (KFRHGL; mit leichten Variationen) von Chemokinrezeptoren (Fan *et al.*, 2001). Diese Aminosäureabfolge konnte in mHCN2-C5 nicht entdeckt werden. Strukturdaten dieses C-terminalen Motivs sind nicht bekannt.

Weiterhin ist in einem Zwei-Hybrid-Versuch die Interaktion vom C-Terminus von PR65 mit Mitgliedern der Importin β -Superfamilie beschrieben worden (Lubert und Sarge, 2003), deren interagierende Regionen keine Ähnlichkeit zu mHCN2-C5 zeigen.

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal systematisch die Interaktionen von mHCN2 Untereinheiten untereinander sowie mit anderen Proteinen untersucht.

4.1 Interaktionen innerhalb des mHCN2

Nach Expression verschiedener mHCN2 Konstrukte als Köder- oder Beuteproteine in Hefezellen konnten mittels des Zwei-Hybrid-Systems Rückschlüsse auf Interaktionen zwischen den verschiedenen zytoplasmatischen Abschnitten des mHCN2 gezogen werden.

Seit längerem wird vermutet, daß verschiedene intrazelluläre Bereiche von Ionenkanälen miteinander in Wechselwirkung treten. Beispielsweise reagieren der N- und der C-Terminus von CNG-Kanälen miteinander, was die Öffnung des Kanals begünstigt (Gordon *et al.*, 1997). Für den mHCN2-Kanal wurde kürzlich eine Homotetramerbildung über die Interaktion einer hoch konservierten N-terminalen Region direkt vor S1 beschrieben (Tran *et al.*, 2002). Darüber hinaus gibt es elektrophysiologische Hinweise auf eine Interaktion intrazellulärer Bestandteile der HCN1- bzw. HCN2-Kernregion mit dem C-Terminus, die entscheidend für die Kinetik des jeweiligen Kanals ist (Wang *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die intrazellulären Bestandteile des mHCN2 systematisch auf eventuelle Interaktionen untersucht werden. Im Zwei-Hybrid-System wurden als Köderproteine mHCN2-C und -C2 eingesetzt, die Beuteproteine waren mHCN2-N, -L23 und -L45 (Abb. 3.1-1 und 3.2-1). Es konnte dabei keine Interaktion zwischen dem mHCN2 C- und N-Terminus nachgewiesen werden. Die von Wang *et al.* (2001) gezeigte Interaktion zwischen der Kernregion und dem C-Terminus konnte mittels der hier beschriebenen Methoden nicht bestätigt werden. Dies mag daran liegen, daß das Zwei-Hybrid-System nicht immer geeignet ist, Protein-Protein-Interaktionen zu offenbaren. In diesem Fall können die gewählten Beuteproteine (mHCN2-L23: 2,5kDa; -L45: 1,8kDa) im Vergleich zum „acid loop“ (18,4kDa) zu klein sein, um sich nativ zu falten oder für eine Interaktion zugänglich zu sein. Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems konnten in diesem Fall keine Interaktionen innerhalb des mHCN2 festgestellt bzw. bestätigt werden. Um dieses Problem zu umgehen, könnte man sich vorstellen, größere Bereiche als Köderprotein zu klonieren, z.B. N+L23 und N+L45. Da bekannt ist, daß mHCN2-N nicht mit dem C-Terminus interagiert, könnte eine hier stattfindende Interaktion auf mHCN2-L23 bzw. -L45 zurückgeführt werden.

4.2 Interaktionen des mHCN2 mit Proteinen der cDNA-Bibliothek

Im vorangehenden Kapitel konnte nicht nachgewiesen werden, daß der C-Terminus des mHCN2 Kanals mit anderen intrazellulären Komponenten desselben Kanals interagiert. Es blieb die Frage offen, ob andere regulatorische oder modulatorische Proteine an diesen Teil des mHCN2 binden, der mit 421AS immerhin fast die Hälfte des gesamten Proteins (863AS)

darstellt. Daß mHCN2 mit Proteinen Wechselwirkungen eingehen kann, wurde in Bezug auf die Bildung von Heterotetrameren in der Zellmembran gezeigt (Much *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2002). Es wurde das Zwei-Hybrid-System eingesetzt, in dem mit dem Köderprotein mHCN2-C in einer cDNA-Bibliothek aus Maus-Herz nach Interaktionspartnern „gefischt“ wurde. Aus der Vielzahl von positiv reagierenden Klonen wurden nur die einer weiteren Untersuchung unterzogen, die am häufigsten vertreten waren und für die eine Funktion im Herzen oder im Zusammenhang mit dem HCN2-Kanal möglich erschien. Im Einzelnen handelte es sich um PR65, die strukturelle α -Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (7 Klone), um Oracle/Cypher, ein Protein, das bei der Funktion des Herzens eine Rolle spielt (5 Klone), um cvHsp, ein herzspezifisches Hitzeschock-Protein (4 Klone) und um PTP TD14, eine Phosphatase, die bisher nur bei der Ratte beschrieben wurde, deren Sequenz aber große Ähnlichkeit zu einem der gefundenen Klone aufwies. Im folgenden wird auf die einzelnen Proteine eingegangen.

4.2.1 PR65

Die am häufigsten vertretenen Klone enthielten Inserts, die als Fragmente des Proteins PR65 identifiziert werden konnten. Dabei handelt es sich um die 65kDa große strukturelle Untereinheit der Protein-Tyrosin-Phosphatase 2A (PP2A), die sich in 15 HEAT-Motive gliedert (Groves *et al.*, 1999; Kobe *et al.*, 1999). HEAT-Motive bestehen im allgemeinen aus 37-43bp langen Bereichen, die sich 3–22 mal innerhalb des Proteins wiederholen. Jede dieser Wiederholungen bildet zwei antiparallele Helices aus, verbunden durch „intrarepeat loops“, die in Protein-Protein-Interaktionen involviert sein können. Da viele Klone eine unterschiedliche Länge aufwiesen, wurde ein Konstrukt kloniert, das in seinem Umfang der Schnittmenge aller Klone entsprach (PR65-k), um eine Interaktion mit mHCN2-C zu bestätigen. PR65-k umfaßte etwa das C-terminale Drittel des Proteins, welches die Bereiche der HEAT-Motive 10-15 enthielt. Für das neu klonierte Fragment konnte die Interaktion mit mHCN2 bestätigt werden. Somit liegt der mit mHCN2 interagierende Bereich innerhalb der letzten sechs HEAT-Motive. Am wahrscheinlichsten davon für eine Interaktion mit nicht-Phosphatase-Untereinheiten sind die abweichend gefalteten Motive 12 und 13, da zwischen den Motiven 13 bis 15 die katalytische Untereinheit PP2Ac bindet. Auf Seiten des mHCN2-Kanals konnte der interagierende Bereich ebenfalls weiter eingeschränkt werden. Im Zwei-Hybrid-System interagierte zwar mHCN2-C, nicht aber mHCN2-C2 mit PR65-k, was den C-Terminus hinter der CNBD ausschloß. Die Interaktion zwischen den beiden gesamten Proteinen mHCN2 und PR65 konnte durch Ko-Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Mit neuen Konstrukten (mHCN2-C5: linker+CNBD, –C6: linker, –C7: CNBD; siehe Abb. 3.3-10) im Zwei-Hybrid-System konnte bestätigt werden, daß die Interaktionsregion im Bereich des C-linkers und der CNBD liegen muß. Im Gegensatz zu mHCN2-C5 reagierte –C7 negativ, was den Schluß zuließ, daß die Interaktion mit dem C-linker stattfindet. mHCN2-C6 erwies sich als unbrauchbar in diesem System. In GST-Pulldown-Experimenten mit PR65-k-GST und mHCN2-C5myc, –C6myc und –C7myc aus bakteriellen Lysaten wurde gezeigt, daß alle drei mHCN2-Konstrukte mit PR65-k-GST gefällt werden konnten. Dies widerspricht den

Ergebnissen aus dem Zwei-Hybrid-Versuch, in dem keine Interaktion von mHCN2-C7 mit PR65 gezeigt werden konnte. Ein Grund dafür könnte in einer unterschiedlichen Sensitivität der zwei Systeme liegen. Einen weiteren problematischen Faktor des Zwei-Hybrid-Systems stellt die Auswahl der Köderproteine und ihre nicht vorhersehbare Eignung dar. Native Strukturen können leicht zerstört sein, wenn das Köderprotein um entscheidende Aminosäuren zu kurz gewählt wurde.

Aus den durchgeführten Versuchen läßt sich schließen, daß eine Interaktion zwischen dem mHCN2-Kanal und der strukturellen α -Untereinheit der Proteinphosphatase 2A möglich ist. Die Region, in der die Interaktion stattfindet, liegt bei PR65 wohl im Bereich der atypisch gefalteten HEAT-Motive 12 und 13, während beim mHCN2 der C-linker und die CNBD die Bindung eingehen. Neuartig ist hieran, daß die Phosphatase direkt mit dem Kanal zu interagieren scheint, während von anderen Kanälen eine indirekte Interaktion über ein Adaptorprotein beschrieben wurde. Z.B. bindet PP2A an das Adaptorprotein PR130, das wiederum über ein Leuzin-Zipper-Motiv (LZ) mit dem Ryanodin Rezeptor 2 interagiert (Marx *et al.*, 2001). Diese indirekte Bindung kann in diesem Fall durch die positiven Ergebnisse des GST-Pulldowns aus bakteriellen Lysaten ausgeschlossen werden. Eine direkte Interaktion von PR65 mit Chemokinrezeptoren wurde beschrieben (Fan *et al.*, 2001), die durch eine Konsensussequenz (KFRHGL) vermittelt wurde. In mHCN2-C5 konnte keine Ähnlichkeit zu dieser Sequenz entdeckt werden, was auf eine weitere Interaktionssequenz für PR65 schließen läßt. Auch die direkte Interaktion der PP2A bzw. ihrer PR65 Untereinheit mit Mitgliedern der β -Importin Familie konnte keinen Hinweis auf eine allgemein gültige Erkennungssequenz geben (Lubert und Sarge, 2003). Eine Phosphorylierung des Kanals erscheint möglich, da sich mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen (Serin, Threonin) im C-Terminus des mHCN2 befinden.

4.2.2 Oracle / Cypher

In weiteren häufig vertretenen Klonen fanden sich Inserts, die C-terminale Ausschnitte des Proteins Oracle bzw. Cypher darstellten. Beide Proteine wurden unabhängig voneinander beschrieben und benannt (Oracle: Passier *et al.*, 2000; Cypher: Zhou *et al.*, 1999). Von Oracle wurden zwei Splicevarianten beschrieben, die sich mit zwei der sechs für Cypher beschriebenen Splicevarianten decken (Huang *et al.*, 2003). Ausgehend von der identifizierten Splicevariante Cypher1c befanden sich alle Klon-Fragmente in verschiedener Länge innerhalb des C-Terminus des Proteins, teilweise bis weit hinter das STOP-Codon. Um den Bereich einzugrenzen, der die Interaktion mit mHCN2 eingeht, wurde ein Konstrukt kloniert, das den allen Klonen gemeinsamen Teil umfaßte (Ora-k). Dieses Teilstück enthält fast alle drei LIM-Domänen (LIM1: die ersten 7 von 51AS fehlen, LIM2: 51AS vollständig, LIM3: die letzten 25 von 55AS fehlen), die durch ihre Cystein-reiche doppelte Zinkfinger-Struktur für Protein-Lokalisierung, die Verbindung multimerer Proteinkomplexe und die Regulierung der Aktivität gebundener Partner bekannt sind (Dawid *et al.*, 1998). Auch für das neue Konstrukt konnte die Interaktion mit mHCN2-C in Hefezellen nachgewiesen werden, während mHCN2-C2 negativ reagierte. Mittels Ko-Immunpräzipitation und anschließender Western

Blot Analyse konnte gezeigt werden, daß sich mHCN2 aus einem Lysat, das heterolog koexprimierten mHCN2 und Oracle-myc enthielt, mit dem gegen das Fusionsprotein gerichteten anti-myc-AK fällen ließ. Im weiteren wurden zur genaueren Bestimmung der interagierenden Bereiche des mHCN2 neue Konstrukte kloniert (mHCN2-C5, -C6, -C7, s.o.), nachdem aufgrund der Ergebnisse im Zwei-Hybrid-Versuch der C-Terminus hinter der CNBD für die Interaktion mit Oracle nicht in Frage kam. Im Zwei-Hybrid-System reagierte Ora-k positiv mit mHCN2-C5 und negativ mit -C7. mHCN2-C6 ist aufgrund seines unspezifischen Verhaltens nicht untersucht worden.

Anhand der durchgeführten Versuche konnte eine Interaktion zwischen mHCN2 und Oracle gezeigt werden. An der Interaktion ist mindestens eine LIM-Domäne von Oracle als auch der Bereich des C-linkers und der CNBD des mHCN2 beteiligt. Da beschrieben wurde, daß Cypher über die PDZ-Domäne an das α -Actinin-2 des Zytoskeletts bindet, ist hier eine Möglichkeit gegeben, daß der mHCN2 über Oracle/Cypher am Zytoskelett verankert wird, um seinen Lage in der Zellmembran zu stabilisieren. Zudem wurde gezeigt, daß Oracle/Cypher nach seiner Expression ab Tag 8,5 p.c. bei der Funktion des Herzens eine Rolle spielt, woran der mHCN2 auch beteiligt ist, was eine „Zusammenarbeit“ sinnvoll erscheinen läßt.

4.2.3 cvHsp und PTP TD14

Als zusätzlich interessant erscheinende Kandidaten wurden das kardiovaskuläre Hitzeschockprotein cvHsp (4 Klone) und ein Klon, dessen Sequenz hohe Homologie zur Protein-Tyrosin-Phosphatase TD14 der Ratte aufwies, zur weiteren Untersuchung ausgewählt.

cvHsp wurde auf der Suche nach Proteinen identifiziert, die selektiv im Herzen exprimiert werden, was ihm seinen Namen gab (Krief *et al.*, 1999). Es handelt sich dabei um ein 170 Aminosäuren langes Protein mit einer Größe zwischen 23 und 25kDa, das im Western Blot zwei Banden zeigt. Es wies die höchste Sequenzhomologie zu Mitgliedern der smHsp Familie (small heat shock protein) auf. Obwohl gut bekannt ist, daß Hsps in pathologischen Situationen überexprimiert werden, in denen sie das Herz schützen (Marber *et al.*, 1993), konnte für cvHsp kein Zusammenhang zwischen verschiedenen pathologischen Herzmodellen und der Expression entdeckt werden. Von cvHsp ist eine Interaktion der Aminosäurereste 56-119 mit dem Zytoskelett-Protein α -Filamin (Aminosäuren 2424-2598) nachgewiesen. Die im Rahmen dieser Arbeit im Zwei-Hybrid-Versuch identifizierten Klone enthielten das komplette Gen.

Bei der Untersuchung der Rolle von Protein-Tyrosin-Phosphatasen beim Wachstum und der Signalübertragung im Herzen wurde in der Ratte eine Phosphatase entdeckt, die PTP TD14 genannt wurde (Cao *et al.*, 1998). Es handelt sich um ein 164kDa großes Protein, dessen C-Terminus die Phosphatase-Domäne enthält, während der N-Terminus keine Ähnlichkeit zu einem anderen Säugetierprotein aufwies, aber zu einem Hefeprotein mit zwei prolinreichen, putativen SH3-Bindungsdomänen. Der Klon, der im Zwei-Hybrid-Screen identifiziert wurde, enthielt ein C-terminales Fragment des Proteins, welches 184AS einschließlich des vorderen

Drittels der katalytischen Domäne umfaßte, und wurde weiter untersucht, da Phosphatasen wegen der diskutierten Phosphorylierung des mHCN2 allgemein interessant waren.

Von cvHsp wurde das in den Klonen enthaltene komplette Gen weiter untersucht, während aufgrund der unbekannten Maus-Sequenz von PTP TD14 nur das PTP-k genannte Fragment berücksichtigt wurde. Mit beiden Konstrukten wurden im Zwei-Hybrid-System weitere Versuche durchgeführt, um die Interaktionsdomäne des mHCN2 weiter einzugrenzen. In ersten Versuchen mit mHCN2-C2 konnte der C-Terminus hinter der CNBD als Interaktionspartner ausgeschlossen werden. In weiteren Zwei-Hybrid-Versuchen war es möglich, die Region der Interaktion des mHCN2 auf den Bereich des C-linkers einzugrenzen. Vermutlich verhält es sich hier wie bei PR65 oder c-Src (4.3), daß das Zwei-Hybrid-System in Kombination mit dem Köderprotein mHCN2-C7 ungeeignet ist, eine dort stattfindende Interaktion zu detektieren.

Die Aminosäuresequenz des identifizierten Teilbereiches von PTP TD14 läßt ein potientes Leuzin-Zipper-Motiv erkennen. Diese Motive interagieren nur miteinander, und in mHCN2-C5 ist kein solches erkennbar, was den Schluß zuläßt, daß die Interaktion nicht über ein Leuzin-Zipper-Motiv stattfindet.

In vom Zwei-Hybrid-System unabhängigen Nachweisen konnten die dort gezeigten Interaktionen bislang nicht bestätigt werden, was eventuell an der schlechten Expression der GST-Fusionsproteine GST-cvHsp und GST-PTP-k in *E. coli* lag.

Die Interaktionen der verschiedenen mHCN2 Köderproteine mit den unterschiedlichen Bibliotheksproteinen sind in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefaßt. Die Bereiche der mHCN2 Konstrukte sind in Abbildung 4.2-1 nochmals gezeigt.

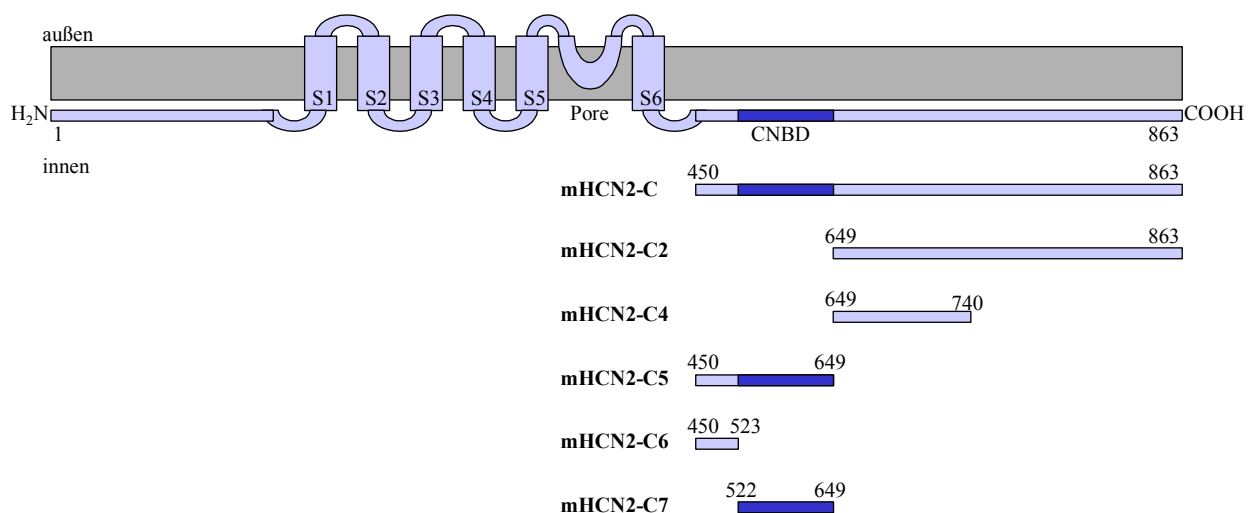


Abb. 4.2-1: schematische Darstellung der untersuchten mHCN2-Bereiche

Tab. 4.2-A: Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die Abschnitte der Proteine mHCN2 und PR65/Ora/cvHsp/PTP, die die Interaktion eingehen. Die Proteinkombinationen, die eine Interaktion eingehen, sind mit + gekennzeichnet. Bei den mit – gekennzeichneten Kombinationen konnte keine Interaktion nachgewiesen werden.

	mHCN2-C	mHCN2-C2	mHCN2-C4	mHCN2-C5	mHCN2-C6	mHCN2-C7
PR65	+	–	–	+	+	+
PR65-k	+	–	–	+	+	+
Oracle	+	–	–	+	+	+
Ora-k	+	–	–	+	+	+
cvHsp	+	–	–	+	+	+
PTP TD14	+	–	–	+	+	+
PTP-k	+	–	–	+	+	+

4.3 c-Src als Interaktionspartner von mHCN2

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die Interaktion zwischen dem mHCN2 Kanal und der zellulären Isoform der Src-Kinase (c-Src) systematisch untersucht. Nach Expression verschiedener mHCN2 C-terminaler Konstrukte als Köderproteine und zweier c-Src Konstrukte als Beuteproteine konnten mittels des Zwei-Hybrid-Systems in Hefezellen Rückschlüsse auf vorhandene Interaktionen gezogen werden. In GST-Pulldown Versuchen konnten diese Interaktionen bestätigt und die interagierende Region eingeschränkt werden.

Die Src-Kinase ist deshalb als potentieller Interaktionspartner der HCN-Kanäle interessant, da von einigen Ionenkanälen beschrieben wurde, daß sie durch Phosphorylierung moduliert werden können. Beispielsweise zeigten Holmes *et al.*, daß die Src-Kinase über ihre SH3 Domäne an eine prolinreiche Region innerhalb des humanen Kaliumkanals Kv1.5 bindet (1996). Dabei wird hKv1.5 von der Src-Kinase phosphoryliert, was den Strom deutlich reduziert. Von Ling *et al.* wurde eine aktivierende Wirkung der Src-Kinase auf BK_{Ca}-Kanäle beschrieben (2000), deren Phosphorylierung zu einer Ca-abhängigen Steigerung der Kanalaktivität führt. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß durch die Inhibition einer Tyrosin-Kinase der von HCN2 vermittelte Strom in *Xenopus* Oozyten reduziert sowie die Aktivierungskinetik verlangsamt wurde (Yu *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem mHCN2 Kanal und der zellulären Src-Kinase mittels Zwei-Hybrid-System und GST-Pulldown nachgewiesen. Im Zwei-Hybrid-System deuteten parallele Versuche mit der kompletten Src-Kinase und deren SH3 Domäne darauf hin, daß die mit mHCN2-C interagierende Region der Src-Kinase die SH3 Domäne ist. Zusätzlich konnte der interagierende Bereich des mHCN2 durch die Köderproteine mHCN2-C und mHCN2-C2 auf die Region des C-linkers und der CNBD eingegrenzt werden. Als Bestätigung der Ergebnisse aus den Hefezellen wurde mit der an GST fusionierten SH3 Domäne der Src-Kinase der komplette mHCN2 aus HEK293-Zelllysaten gefällt. Um die

Region, in der die Interaktion im mHCN2 stattfindet, weiter einzuschränken, wurden Konstrukte in den Vektor pEG202 kloniert, die nur den C-linker (mHCN2-C6) oder nur die CNBD (mHCN2-C7) umfaßten, dazu ein Konstrukt über den gesamten Bereich des C-linkers und der CNBD (mHCN2-C5) als Positivkontrolle. Im Zwei-Hybrid-System wurde die obige Annahme bestätigt, da mHCN2-C5 sowohl mit der Src-Kinase als auch mit ihrer SH3 Domäne interagierte. Das Köderprotein, das den C-linker umfaßte, war untauglich, da es die Transkription der Reportergene *lacZ* und *leu2* unspezifisch aktivierte, weshalb hierüber keine Aussage möglich ist. Das Köderprotein, das die CNBD umfaßte, reagierte im Zwei-Hybrid-Versuch negativ, was zu der Vermutung führte, daß die Interaktionsregion im Bereich des C-linkers liegt. Um die Interaktion von mHCN2-C6 mit der Src-Kinase aufzuklären, wurden oben genannte Konstrukte in den GST-Vektor pET41a umkloniert. Im GST-Pulldown war es möglich, die Src-Kinase aus HEK293-Zelllysaten zu fällen, allerdings fanden sich auch Banden in zwei der Negativkontrollen, was auf eine unspezifische Bindung der Src-Kinase an GST-beladene und leere Glutathion-Sepharose-beads zurückzuführen war. Auch höhere Salzkonzentrationen konnten diese Bindungen nicht verhindern. Wahrscheinlich lag das an den großen Konzentrationsunterschieden zwischen dem exprimierten GST-Fusionsprotein und GST alleine. In einer 1:50 Verdünnung entsprach der Proteinanteil des GST dem des mHCN2-C5/-C6-GST, die Banden in der Negativkontrolle wurden auch deutlich schwächer, so daß wohl nur ein Teil der positiven Bande auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen war. Eventuell lag das Problem aber auch darin, daß z.B. mHCN2-C6 mit einer Größe von 8kDa fusioniert an GST mit 35kDa sich nicht nativ faltet oder nicht mehr für eine spezifische Interaktion zugänglich ist. Um ähnliche Probleme bei der weiteren Untersuchung zu vermeiden, wurden mHCN2-C5, -C6 und -C7 in den bakteriellen Expressionsvektor pRSET-A umkloniert und C-terminal des Inserts ein wesentlich kleinerer myc-tag (600Da, zusammen mit dem im Vektor vorhandenen N-terminalen His-tag 8,8kDa) eingefügt. Dadurch war es möglich, den GST-Pulldown mit SH3-GST und bakteriellen Lysaten mit mHCN2-C5myc, -C6myc und -C7myc durchzuführen. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß sowohl der C-linker (mHCN2-C6myc) als auch die CNBD (-C7myc) mit der SH3 Domäne der Src-Kinase interagierten. Der Widerspruch zu den Ergebnissen der Zwei-Hybrid-Analyse, in dem die CNBD negativ reagierte, mag in einer unterschiedlichen Sensitivität der Systeme liegen. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die SH3 Domäne an zwei Punkten mit dem mHCN2 interagiert, einmal innerhalb des C-linkers und einmal innerhalb der CNBD. Die Bindung an die CNBD ist allerdings so schwach, daß sie im Zwei-Hybrid-Versuch die Transkription nicht zu aktivieren vermag. Über die Stärke der Bindung an mHCN2-C6 ist keine derartige Aussage möglich, da das Köderprotein in den Hefezellen unbrauchbar war. Aber C-linker und CNBD zusammen (mHCN2-C5) konnten in beiden Fällen eine Interaktion mit SH3 eingehen. Über die Sequenz, an die SH3 bindet, können nur Vermutungen angestellt werden. Eine klassische Sequenz ist die prolinreiche Region mit der Konsensussequenz RPLPXXP, die aber im mHCN2-C-Terminus nicht vorhanden ist. Allerdings gibt es davon abweichende Sequenzen, z.B. im C-Terminus des β 3-Intergrins (Arias-Salgado *et al.*, 2003), was darauf schließen läßt, daß weitere bisher nicht

beschriebene Bindungssequenzen existieren. Ein Sequenzvergleich des mHCN2-C5 und des mit c-Src interagierenden Bereichs des β 3-Intergrins auf Aminosäure-Ebene ergab eine gewisse Homologie. Daraufhin wurden die beiden Sequenzen nach strukturellen Ähnlichkeiten untersucht. Der C-linker bildet mehrere α -Helices aus. Auch für den zytoplasmatischen Teil des β 3-Intergrins ist die Ausbildung einer α -Helix beschrieben (Ulmer *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde nur der intrazelluläre C-Terminus des Integrins betrachtet, der über verschieden lange linker an eine Transmembrandomäne fusioniert war. In Abhängigkeit der Länge des linkers wurden verschieden lange α -Helices ausgebildet (linker (Gly)₃: α -Helix zwischen AS 724-735, pink in Abb. 3.3-18; kein linker: α -Helix zwischen AS 716-735, rosa in abb. 3.3-18). Aufgrund der Homologie der Sequenzen und der Ausbildung von α -Helices in beiden Fällen konnte die interagierende Region des mHCN2 auf den C-linker eingegrenzt werden. Anhand der GST-Pulldown-Ergebnisse können jedoch weitere Interaktionspunkte, z.B. in der CNBD, nicht ausgeschlossen werden.

Tab. 4.3-A zeigt abschließend eine Zusammenfassung, welche Bereiche der Proteine mHCN2 und c-Src an der Interaktion beteiligt sind. Eine Übersicht über die untersuchten mHCN2 Bereiche gibt Abb. 4.2-1.

Tab. 4.3-A: Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die Abschnitte der Proteine mHCN2 und c-Src, die die Interaktion eingehen. Die Proteinkombinationen, die eine Interaktion eingehen, sind mit + gekennzeichnet. Bei den mit – gekennzeichneten Kombinationen konnte keine Interaktion nachgewiesen werden.

	mHCN2-C	mHCN2-C2	mHCN2-C4	mHCN2-C5	mHCN2-C6	mHCN2-C7
c-Src	+	–	–	+	+	+
SH3	+	–	–	+	+	+

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß die SH3 Domäne der zellulären Isoform der Src-Kinase mit dem mHCN2 interagiert. Dies ist interessant, da der HCN1 Kanal in einer Zwei-Hybrid-Untersuchung identifiziert wurde, in der die SH3 Domäne der neuronalen Isoform als Köderprotein diente (Santoro *et al.*, 1997). Diese Übereinstimmung bestärkt die Ergebnisse, daß auf Seiten des Kanals die Interaktion innerhalb des C-linkers und der CNBD stattfindet, da hier die größte Homologie zwischen den mHCN1 und mHCN2 C-Termini auftritt. Da kürzlich die Phosphorylierung des HCN2 beschrieben wurde (Yu *et al.*, 2003), wäre es denkbar, mit der Src-Kinase die phosphorylierende Kraft identifiziert zu haben.

4.4 Interaktionsbereich des mHCN2

In der vorliegenden Arbeit konnten verschiedene Proteine als Interaktionspartner von mHCN2 identifiziert und die jeweils interagierenden Bereiche eingegrenzt werden. Auffallend war, daß sich alle Interaktionen auf seiten des mHCN2 im Bereich des C-linkers und der CNBD abspielten. Es konnten keine Interaktionspartner für den C-Terminus nach der CNBD identifiziert werden. Bei der Betrachtung des Strukturmodells von Zagotta *et al.* (2003), durch das auch die tetramere Struktur der HCN-Untereinheiten bestätigt werden konnte, erkennt man deutlich, daß sowohl der C-linker als auch die CNBD von außen gut zugängliche Bereiche enthalten (Abb. 4.4-1 (A) links). Auch in der Aufsicht sind die exponierten Bereiche gut zu sehen (Abb. 4.4-1 (A) rechts).

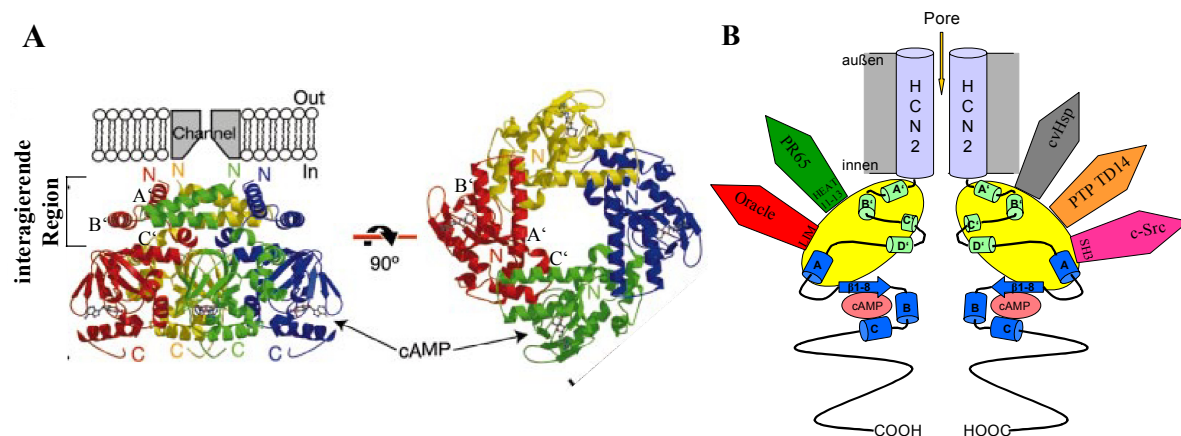


Abb. 4.4-1: Schematische Darstellung der Topologie des C-linkers und der CNBD eines HCN2 Kanals

(A) Die Abbildung zeigt die Struktur des C-linkers und der CNBD mit gebundenem cAMP (nach Zagotta *et al.*, 2003; siehe auch Abb. 1.2-2)

(B) Die Abbildung zeigt ein vereinfachtes Schema zweier mHCN2 Kanäle, in dem die Bindungsregion der identifizierten Proteine durch den gelben Hintergrund hervorgehoben wird. Die Lage der interagierenden Proteine ist willkürlich, der interagierende Bestandteil ist jeweils angegeben (soweit bekannt).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß die zugänglichen Bereiche des C-linkers sowie der CNBD eine Art Interaktionsoberfläche des mHCN2 darstellen, an der verschiedene Bindungspartner binden können (Abb. 4.4-1 (B)).

Von der Src-Kinase wurde eine Interaktion mit dem zytoplasmatischen Teil des $\beta 3$ -Integrins beschrieben (Arias-Salgado *et al.*, 2003). Ein Vergleich dieser Sequenz mit der des mHCN2-C5 Konstruktes (Abb. 3.3-18) ergibt eine gewisse Ähnlichkeit, in deren Bereich in beiden Fällen eine α -Helix ausgebildet wird. Wenn also die Src-Kinase mit der α -Helix des $\beta 3$ -Integrins interagiert, besteht die Möglichkeit, daß sie die Bindung zu mHCN2 über eine der exponierten Helices des C-linkers eingeht.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die HCN Kanäle sind als molekulare Komponente des I_h Stromes maßgeblich an der Entstehung rhythmischer Erregung beteiligt. Die Genfamilie besteht aus 4 Mitgliedern (HCN1-HCN4), die durch Hyperpolarisation aktiviert und von zyklischen Nukleotiden moduliert werden und sowohl Natrium als auch Kalium leiten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen zwischen mHCN2 Untereinheiten sowie mit Proteinen aus einer cDNA-Bibliothek aus Maus-Herz untersucht. Außerdem wurde der Frage nachgegangen, ob die Src-Kinase mit mHCN2 interagiert.

Die Wechselwirkungen des mHCN2 C-Terminus mit verschiedenen zytoplasmatischen Komponenten desselben Kanals wurde mittels des Zwei-Hybrid-Systems untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß der C-Terminus nicht mit dem N-Terminus interagiert, während für die intrazellulären Bereiche zwischen den Transmembrandomänen S2 und S3 bzw. S4 und S5 keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte.

Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems und mHCN2-C als Köderprotein wurde eine cDNA Bibliothek aus Maus-Herz nach Interaktionspartnern durchsucht. Von den dabei identifizierten Proteinen wurden vier für die weitere Arbeit ausgewählt. Dabei handelte es sich um PR65, die strukturelle α -Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, um Oracle/Cypher, ein für die Funktion des Herzens unerläßliches Protein, um cvHsp, ein herzspezifisches Hitzeschockprotein und um PTP TD14, eine weitere Phosphatase, die bisher nur aus der Ratte beschrieben war. Die interagierende Region konnte bei PR65 auf die letzten sechs HEAT-Motive eingeschränkt werden, die mit mHCN2-C interagierenden sind wahrscheinlich die atypisch gefalteten HEAT-Motive 12 und 13. Bei Oracle befindet sich die mit mHCN2-C interagierende Region in einer der drei C-terminalen LIM-Domänen. Bei cvHsp wurde die interagierende Region innerhalb der 170 Aminosäuren nicht weiter eingegrenzt. Bei der PTP TD14 lag der Bereich, der mit mHCN2-C wechselwirkte, vor bzw. im ersten Drittel der katalytischen Domäne, wo ein mögliches „leucin zipper“-Motiv erkennbar ist, das allerdings den Gegenpart im mHCN2 vermissen läßt. Auf Seiten des mHCN2 konnte die interagierende Region in allen vier Fällen mittels Zwei-Hybrid-System und GST-Pulldown auf den C-linker und die CNBD eingeschränkt werden. Einige anfängliche Versuche ergaben, daß auch der C-Terminus des hHCN4 mit den identifizierten Proteinen interagiert. Auch dies ist ein Hinweis auf den C-linker und die CNBD als interagierende Region, da hier die größte Homologie zwischen den Kanälen im Bereich des C-Terminus zu finden ist.

Als weiterer potentieller Interaktionspartner für mHCN2 wurde die Src-Kinase untersucht. Im Zwei-Hybrid-System konnte die interagierende Region auf die SH3 Domäne des Proteins eingegrenzt werden, die mit dem Bereich des C-linkers und der CNBD des mHCN2 interagiert, und in Kombination mit den aus der Bibliothek identifizierten Proteinen einen weiteren Hinweis auf eine Phosphorylierung des Kanals darstellt.

6 ANHANG

6.1 Restriktionsenzyme

Tab. 1 Verwendete Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz (5'-3')	Puffer	Zusatz von BSA	Inkubationstemperatur
AccI	GT/(AC)(TG)AC	NEB 4	-	37°C
AgeI	A/CCGGT	NEB 1	-	37°C
ApaLI	G/TGCAC	NEB 4	+	37°C
BamHI	G/GATCC	NEB U	+	37°C
Bsu36I	CC/TNAGG	NEB 3	+	37°C
BstX I	CCACTTCTG/TGG	NEB 3	-	55°C
EcoRI	G/AATTC	NEB U	-	37°C
HindIII	A/AGCTT	NEB 2	-	37°C
KpnI	GGTAC/C	NEB 1	+	37°C
NheI	G/CTAGC	NEB 2	+	37°C
PflMI	CCANNNN/NTGG	NEB 3	+	37°C
Pst I	CTGCA/G	NEB 3	+	37°C
Sal I	G/TCGAC	NEB U	+	37°C
SspI	AAT/ATT	NEB U	-	37°C
Sst I (=Sac I)	G/AGCTC	NEB 1	+	37°C
XbaI	T/CTAGA	NEB 2	+	37°C
XhoI	C/TCGAG	NEB 2	+	37°C

N steht für ein beliebiges Nukleotid, Pu und Py für Purin bzw. Pyrimidin. Die Schnittstellen sind mit / gekennzeichnet. Puffer U sind für das jeweilige Enzym spezifisch. In Klammern geschriebene Basen kennzeichnen solche, die gegeneinander ausgetauscht werden können.

6.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide binden an die jeweils aufgeführten Gene bzw. Vektoren.

Die Nummerierung der Vektoren wurde von den jeweiligen Herstellern übernommen.

Die kodierenden Bereiche der Gene wurden folgendermassen nummeriert:

Bezeichnung	Gen	Accession Number	ATG	Stop
mHCN2	muriner HCN2	NM 008226	36	2627
hHCN4	humaner HCN4	AJ132429	567	4178
mPR65	murines PR65	BC006606	53	1822
mOra	murines Cypher (auch Oracle)	AY206012 (AF228057)	74	2245
mcvHsp	murines kardiovaskuläres Hitzeschockprotein	AF155909	77	585
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase TD14 der Ratte	NM057204	130	4614
c-Src	zelluläre Src-Kinase des Huhns	V00402	112	1713

Tab. 2 Verwendete Oligonukleotide der Fa. MWG

Name	Gen	Sequenz in 5'-3' Richtung	Bindungsstelle
207R	mHCN2	ATC ATG GGG TAT TCC TCC AGC AC	nt 1875-1897
HA1F	mHCN2	GCC GCG AAT TCC AGG AGA AGT ACA AGC AAG T	nt 1375-1402
HA2F	hHCN4	GGA TAT CGC CGA GCT CGA ATT CCA GGA AAA GTA CAA GCA GGT G	nt 2141-2168
HA3F	hHCN4	GGA TAT CGC CGA GCT CGA ATT CAA CTC CGG CGT CTT CAA CTA C	nt 2748-2774
HA4R	hHCN4	GGC GCG TCG ACA TCA CAG TTA AAC CTG AAG GAA G	nt 4226-4259
HA7F	mHCN2	GCC ATA GAG GGA CGT AGG T	nt 2714-2732
HA8R	hHCN4	CGT TTC AGG TGC CTT GGC GT	nt 3030-3049
HA8Rm	hHCN4	CAT GCC CCA TGG GTC GAC CGT TTC AGG TGC CTT GGC GT	nt 3013-3049
HA9F	mPR65	GAA TTC ACC ATC GAA CAC CTC TTG	nt 1127-1150
HA10R	mPR65	CTC GAG CAT CAG GCA AGA GAG AGA AC	nt 1805-1830
HA11F	mOra	GAA TTC ATC AGG GGC CCT TTT CTG	nt 1727-1750
HA12R	mOra	CTC GAG GGC ACA AAT GAA GCA GGT G	nt 2137-2161
HA13F	mOra	AGG AAT TCA CCG CTG TCA GCA CCA G	nt 48-72
HA14R	mOra	GGC TCG AGC ACG TTG ATG GCA TGT G	nt 2226-2250
HA17F	mOra	GCC TAT TCC CAT CTC CAC GAC AGC	nt 328-351
HA18R	mOra	TGC AGG CTG CAC AGA CAA AGC AG	nt 1957-1979
HA19F	mOra	CAG TCA GCC CCA AAG TTC TGC C	nt 603-624
HA20R	mOra	ATT GTT ACA GTG CCC ACA GAG GG	nt 1706-1728
HA21F	mOra	GAT GAA GAG GCT CTG CGA AGG TC	nt 935-957
HA22F	mOra	AAG CCT CGG GTC GTA ACC ACT GC	nt 1241-1263
HA23F	mOra	CTT CAG AAT CTG CCA GCC GTC CAC	nt 1503-1526

HA24R	mOra	CTG TAG GCA GCT GAT GGT GTA GG	nt 1472-1494
HA25R	mOra	GAC CCT CGC TGT AGC TGG TAT GG	nt 1201-1223
HA26R	mOra	GAA GGA GCG AGA CTG CAG GTT GG	nt 867-889
HA27R	mOra	GCA GAA CTT TGG GGC TGA CTG AG	nt 601-626
HA28R	mOra	TTC TGT AGA GTG AGG CTC AGG TTG	nt 295-318
HA29F	mPR65	GCG AAT TCG CCG CCA CCA TGG CAG CTG CCG ACG GTG ACG ATT C	nt 36-78
HA30R	mPR65	GGC CTC GAG GCA AGA GAG AGA ACA GTC AGA GCC TG	nt 1793-1827
HA31F	mPR65	AGT ACG AGA CAA GGC GGT AG	nt 361-380
HA32F	mPR65	GAG ATC ATT CCC ATG TTC TC	nt 662-681
HA33F	mPR65	AGT AGA GAA GTT CGG GAA GG	nt 1459-1478
HA34R	mPR65	TCC TTC CCG AAC TTC TCT AC	nt 1460-1479
HA35R	mPR65	ACA CTC ATC CTT CAG CTG AGC	nt 1163-1183
HA36R	mPR65	CCC ACT GCT TTC TGG AGC TC	nt 857-876
HA37R	mPR65	TGT CAT CTG AGC ACA GGT TCC G	nt 563-584
HA38R	mPR65	GTG AAG GTT CCC AGC TGT TC	nt 263-282
HA39F	mcvHsp	GCG AAT TCG CCG CCA CCA TGA GCC ATC GGA CCT CCT CCG CCT C	nt 60-102
HA40R	mcvHsp	GGC CTC GAG ATT TTT ATC TCC GTC CGG AAG GTC	nt 558-590
HA45F	mOra	GCG AAT TCG CCG CCA CCA TGT CTT ACA GTG TGA CTC TGA C	nt 57-96
HA46R	mHCN2	CTC TCG AGG TGG ATG ATC CAG GC	nt 555-577
HA47F	mHCN2	GCG AAT TCA TTG TTA TTG AGG ACA ACA C	nt 745-772
HA48R	mHCN2	GAA CTC GAG ACG CAA GTA CTT CTT CTT	nt 801-827
HA49P	mHCN2	AAT TCT GGG AAG AGA TTT TCC ACA TGA CCT ACG ACC TGG CAA GTG CAG TGA TGC	nt 1002-1049
HA50P	mHCN2	TCG AGC ATC ACT GCA CTT CCC AGG TCG TAG GTC ATG TGG AAA ATC TCT TCC CAG	nt 1002-1049
HA51F	PTP	AGG CAC AGG AAC ACG ATG C	nt im Intron
HA52F	PTP	GGA AAC ACA TGC TGC AGG A	nt 3998-4016
HA53F	PTP	GGT GCA TGA ACA GAA AGT GTC	nt 3531-3551
HA54R	PTP	ATG TGT TTC CTC TGC TGC C	nt 3989-4007
HA55F	PTP	ATC AGA GCC TCA AGC GCT C	nt 3722-3740
HA56R	PTP	CGC CAC CTT TTG CTG AAG G	nt im Intron
HA57R	PTP	GCC TCG AGC TTT TCC ATC TCA G	nt 3578-3591
HA58F	mcvHsp	GGG GCC AAG GAA ACA TCA A	nt 282-300
HA59R	mcvHsp	AAC TTC TCA GCC CGC ACC T	nt 390-408
HA60F	mHCN2	TGG AAT TCG TTC AGC ATG ATC TCA GCT C	nt 1966-1993

HA61R	mHCN2	AAG CGA CGT GCG GGC AAT	nt 2372-2389
HA62F	mOra	AGA CCC TGC CCC GGG GGG CT	nt 1596-1615
HA63R	mOra	AGC CCC CCG GGG CAG GGT CT	nt 1596-1615
HA64F	c-Src	GCG AAT TCA CCA CTT TCG TGG CTC TCT A	nt 353-380
HA65R	c-Src	GAC TCG AGG GGC GCG ACA TAG TTA CTG G	nt 509-536
HA66F	c-Src	CCG AAT TCA TGG GGA GCA GCA AGA GCA A	nt 104-131
HA67F	mHCN2	GTC GCT CTC GAG GTG GAT GAT CC	nt 551-573
HA68F	mHCN2	ACC GAA TTC CTC ACC CTA CGG TGT	nt 2315-2338
HA69F	hHCN4	CAC GAA TTC TTG CTC CTG CCA CC	nt 3711-3733
HA70R	mHCN2	AAC TCG AGG TCT GCA TTG GCA AAC AGC G	nt 1582-1609
HA71F	mHCN2	ATG AAT TCC CCA ACT TCG TCA CAG CCA T	nt 1594-1621
HA72R	mHCN2	TGC TCG AGC TTG TGC AGC AAG ATG GAG T	nt 1964-1981
M13-F	pCR2.1TOPO	GTA AAA CGA CGG CCA G	nt 391-406
M13-R	pCR2.1TOPO	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	nt 205-222
pcDNA3-F	pcDNA3(.1)	CTA GAG AAC CCA CTG CTT	nt 829-846
pcDNA3-R	pcDNA3(.1)	GCA CAG TCG AGG CTG ATC	nt 1076-1093
HA5F	pEG202	CGT CAG CAG AGC TTC ACC ATT G	nt 2081-2102
HA6R	pEG202	CCT GAG AAA GCA ACC TGA CCT	nt 2312-2332
pET41-F	pET41a(+)	CGA ACG CCA GCA CAT GGA CA	nt 312-331
pET41-R	pET41a(+)	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	nt 69-87
pRK5-F	pRK5	TCC ACT CCC AGG TCC AAC T	nt 880-898
pRK5-R	pRK5	GTG AAA TTT GTG ATG CTA TTG C	nt 1056-1077
pRSET-F	pRSET-A	ATG CGG GGT TCT CAT CAT CA	nt 100-119
pRSET-R	pRSET-A	CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG	nt 294-315
pUC-F	pUC18	GTA AAA CGA CGG CCA GT	nt 379-395
pUC-R	pUC18	GAA ACA GCT ATG ACC ATG	nt 461-478
TH5	pJG4-5	CTG AGT GGA GAT GCC TCC	nt 798-815
TH7	pJG4-5	GAC AAC CTT GAT TGG AGA CTT	nt 899-919
HAmyc-F		GCG AAC AAA AAC TTA TTT CTG AAG AAG ATC TGC GA	
HAmyc-R		AGC TTC GCA GAT CTT CTT CAG AAA TAA GTT TTT GTT CGC TGC A	

Fett geschriebene Basen heben eingefügte Schnittstellen hervor, durch die eine Klonierung möglich wurde.

6.3 Drei-Buchstaben-Code und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

7 LITERATURVERZEICHNIS

7.1 Zitierte Veröffentlichungen

Altenhofen W, Ludwig J, Eismann E, Kraus W, Bönigk W, Kaupp UB (1991) Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88: 9868-9872

Arias-Salgado EG, Lizano S, Sarkar S, Brugge JS, Ginsberg MH, Shattil SJ (2003) Src kinase activation by direct interaction with the integrin β cytoplasmic domain. *PNAS* 100: 13298-13302

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1995) Current protocols in molecular biology, Chapters 13 and 20. John Wiley & Sons, Inc., New York

Baker K, Warren KS, Yellen G and Fishman MC (1997) Defektive 'pacemaker' current (I_h) in an zebrafish mutant with slow heart rate. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94: 4554-4559

Bell DC, Yao H, Saenger RC, Riley JH, Siegelbaum SA (2004) Changes in local S4 environment provide a voltage-sensing mechanism for mammalian hyperpolarization-activated HCN channels. *J.Gen.Physiol.* 1: 5-19

Bennett E, Urcan MS, Tinkle SS, Koszowski AG, Levinson SR (1997) Contribution of sialic acid to the voltage dependence of sodium channel gating. *J.Gen.Physiol.* 109: 327-343

Biel M, Ludwig A, Zong X, Hofmann F (1999a) Hyperpolarization-activated cation channels: A multi-gene family. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* 136: 165-182

Biel M, Schneider A, Wahl C (2002) Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc.Med.* 12: 206-213

Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F (1999b) Structure and function of cyclic nucleotide gated channels. *Annu.Rev.Neurosci.* 19: 235-263

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid. *Nucl.Acids Res.* 7: 1513-1518

Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heynecker HL, Boyer HW, Crosa JW, Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113

- Bosch M, Cayla X, Van Hoof C, Hemmings BA, Ozon R, Merlevede W, Goris J (1995) The PR55 and PR65 subunits of protein phosphatase 2A from *Xenopus laevis*: molecular cloning and developmental regulation of expression. *Eur. J. Biochem.* 230: 1037-1045
- Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ (1979) How does adrenalin accelerate the heart? *Nature* 280: 235-236
- Cao L, Zhang L, Ruiz-Lozano P, Yang Q, Chien KR, Graham RM, Zhou M (1998) A novel putative protein-tyrosine phosphatase contains a BRO1-like domain and suppresses Ha-ras-mediated transformation. *J. Biol. Chem.* 273: 21077-21083
- Cerbai E, Barbieri M, Mugelli A (1994) Characterization of the hyperpolarization-activated current, I_f , in ventricular myocytes isolated from hypertensive rats. *J. Physiol.* 481: 585-591
- Cerbai E, Pino R, Porciatti F, Sani G, Toscano M, Maccherini M, Giunti G, Mugelli A (1997) Characterization of the hyperpolarization-activated current, I_f , in ventricular myocytes from human failing heart. *Circulation* 95: 568-571
- Cerbai E, Sartiani L, DePaoli P, Pino R, Maccherini M, Bizzarri F, DiCiolla F, Davoli G, Sani G, Mugelli A (2001) The properties of the pacemaker current I_f in human ventricular myocytes are modulated by cardiac disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33: 441-448
- Chan B, Lanyi A, Song HK, Griesbach J, Simarro-Grande M, Poy F, Howie D, Sumegi J, Terhorst C, Eck MJ (2003) SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nature Cell Biol.* 5: 155-160
- Chaplan SR, Guo H-Q, Lee DH, Luo L, Liu C, Kuei C, Velumian AA, Butler MP, Brown SM, Dubin AE (2003) Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J. Neurosci.* 23: 1169-1178
- Chen J, Mitcheson IS, Lin M, Sanguinetti MC (2000) Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J. Biol. Chem.* 275: 36465-36471
- Chen J, Mitcheson JS, Tristani-Firouzi M, Lin M, Sanguinetti MC (2001) The S4-S5 linker couples voltage sensing and activation of pacemaker channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11277-11282
- Chen S, Wang J, Siegelbaum SA (2001) Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J. Gen. Physiol.* 117 : 491-503

- Chenais F, Virella G, Patrick CC, Fudenberg HH (1977) Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A-Sepharose as substrate. *J.Immunol.Methods* 18: 183-192
- Clapham DE (1998) Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron* 21: 5-7
- Davare MA, Horne MC, Hell JW (2000) Protein phosphatase 2A is associated with class C L-type calcium channels (Ca_v1.2) and antagonizes channel phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* 275: 39710-39717
- Dawid IB, Breen JJ, Toyama R (1998) LIM-domains: multiple roles as adaptors and functional modifiers in protein interactions. *TIG* 14: 156-162
- Demontis GC, Longoni B, Barcaro U, Cervetto L (1999) Properties and functional roles of hyperpolarization-gated currents in guinea-pig retinal rods. *J.Physiol.* 515: 813-828
- Demontis GC, Moroni A, Gravante B, Altomare C, Longoni B, Cervetto L, DiFrancesco D (2002) Functional characterization and subcellular localization of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors. *J.Physiol.* 542: 89-97
- DiFrancesco D (1981) A new interpretation of the pacemaker current in calf purkinje fibres. *J.Physiol.* 314: 359-376
- DiFrancesco D (1993) Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu.Rev.Physiol.* 55: 455-472
- DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C (1986) Properties of the hyperpolarizing-activated current (I_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J.Physiol.* 377: 61-88
- DiFrancesco D, Tortora P (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular AMP. *Nature* 351: 145-147
- Doyle DA, Cabral JM, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77
- Eagle H. (1959) Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130:432-437
- Er F, Larbig R, Ludwig A, Biel M, Hofmann F, Beuckelmann DJ, Hoppe UC (2003) Dominant-negative suppression of HCN channels markedly reduces the native pacemaker current I_f and undermines spontaneous beating of neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 107: 485-489

- Fan GH, Yang W, Sai J, Richmond A (2001) Phosphorylation-independent association of CXCR2 with the protein phosphatase 2A core enzyme. *J.Biol.Chem.* 276: 16960-16968
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roma R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielson M (1987) Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:7413-7417
- Gauss R, Seifert R, Kaupp UB (1998) Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393: 583-587
- Gloss B, Trost SU, Bluhm WF, Swanson EA, Clark R, Winkfein R, Janzen K, Giles W, Chassande O, Samarut J, Dillmann W (2001) Cardiac ion channel expression and contractile function in mice with deletion of thyroid hormone receptor alpha or beta. *Endocrinology* 142: 544-550
- Gordon SE, Varnum MD, Zagotta WN (1997) Direct interaction between amino- and carboxyl-terminal domains of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 19 : 431-441
- Graf EM, Heubach JF, Ravens U (2001) The hyperpolarization-activated current I_f in ventricular myocytes of non-transgenic and β_2 -adrenoceptor overexpressing mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 364: 131-139
- Graham FL, Smiley J. (1973) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456
- Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456
- Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemmings BA, Barford D (1999) The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* 96: 99-110
- Halliwel JV, Adams PR (1982) Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* 250: 71-92
- Herrmann S, Stieber J, Feil S, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2003) Pacemaker channel HCN4 is required for normal cardiac function in the mouse embryo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 367: R91
- Ho WK, Brown HF, Noble D (1994) High selectivity of the I_f channels to Na^+ and K^+ in rabbit isolated sinoatrial node cells. *Pflügers Arch.* 426: 68-74

Huang C, Zhou Q, Liang P, Hollander MS, Sheikh F, Li X, Greaser M, Shelton GD, Evans S, Chen J (2003) Characterization and *in vivo* functional analysis of splice variants of Cypher. *J.Biol.Chem.* 278: 7360-7365

Huang CC, Hsu KS (2003) Reexamination of the role of hyperpolarization-activated cation channels in short- and long-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuropharmacology* 44: 968-981

Ingram SL, Williams JT (1996) Modulation of the hyperpolarization-activated current (I_h) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons. *J.Physiol.* 492: 97-106

Ishii T, Takano M, Xie L, Noma A, Ohmori H (1999) Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J.Biol.Chem.* 274: 12835-12839

Ishii TM, Takano M, Ohmori H (2001) Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels. *J.Physiol. (London)* 537: 93-100

Kobe B, Gleichmann T, Horne J, Jennings IG, Scotney PD and Teh T (1999) Turn up the HEAT. *Structure* 7: R91-R97

Krief S, Faivre JF, Robert P, LeDouarin B, Brument-Larignon N, Lefrère I, Bouzyk MM, Anderson KM, Greller LD, Tobin FL, Souchet M, Bril A (1999) Identification and characterization of cvHsp. *J.Biol.Chem.* 274: 36592-36600

Lämmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lu Z, Klem AM, Ramu Y (2001) Ion conduction pore is conserved among potassium channels. *Nature* 413: 809-813

Lubert EJ, Sarge KD (2003) Interactions between protein phosphatase 2A and members of the importin β superfamily. *Biochem.Biophys.Res.Com.* 303: 908-913

Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, Holthoff K, Langebartels A, Wotjak C, Munsch T, Zong X, Feil S, Feil R, Lancel M, Chien KR, Konnerth A, Pape HC, Biel M, Hofmann F (2003) Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *EMBO* 22 No.2: 216-224

Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M (1999) Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol.Biochem.* 9: 179-186

Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591

- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* 18 (9), 2323-2329
- Lüthi A, McCormick DA (1998) H-current: properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* 21: 9-12
- Magee J (1999) Dendritic I_h normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat. Neurosci.* 2: 508-514
- Mandel M, Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J.Mol.Biol.* 53: 159-162
- Mayer BJ (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J.CellSci.* 114: 1253-1263
- McCormick D and Pape HC (1990) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurons. *J.Physiol.* 432: 291-318
- Monteggia LM, Eisch AJ, Tang MD, Kaczmarek LK, Nestler EJ (2000) Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 81 : 129-139
- Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (1999) Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol.Chem.* 380: 975-980
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2001) Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur.J.Biochem.* 268: 1646-1652
- Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME, Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A, DiFrancesco D (2001) Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I_f . *J.Biol.Chem.* 276: 29233-29241
- Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A, Biel M (2003) Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated channels. *J.Biol.Chem.* 278: 43781-43786
- Munsch T, Pape HC (1999) Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurons by intracellular pH. *J.Physiol. (London)* 519: 493-504

- Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT, Santoro B, Yin D, Thompson RF, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2003) The hyperpolarization activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell* (115): 551-564
- Noma A (1996) Ionic mechanisms of the cardiac pacemaker potential. *Jpn.Heart J.* 37: 673-682
- Okabe K, Inoue Y, Kawarabayashi T, Kajiya H, Okamoto F and Soeda H (1999) Physiological significance of hyperpolarization-activated inward currents (I_h) in smooth muscle cells from the circular layers of pregnant rat myometrium. *Pflügers Arch.* 439: 76-85
- Pachucki J, Burmeister LA, Larsen PR (1999) Thyroid hormone regulates hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN2) mRNA in the rat heart. *Circ.Res.* 85: 498-503
- Pape HC (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu.Rev.Physiol.* 58: 299-327
- Passier R, Richardson JA, Olson EN (2000) Oracle, a novel PDZ-LIM domain protein expressed in heart and skeletal muscle. *Mech.Dev.* 92: 277-284
- Pfeifer A, Dostmann WRG, Sausbier M, Klatt P, Ruth P, Hofmann F (1999) cGMP-dependent protein kinases: Structure and function. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* 135: 105-150
- Proenza C, Tran N, Angoli D, Zahynacz K, Balcar P, Accili EA (2002) Different roles for the cyclic nucleotide binding domain and amino terminus in assembly and expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channels. *J.Biol.Chem.* 277: 29634-29642
- Rothberg BS, Shin KS, Phale PS, Yellen G (2002) Voltage-controlled gating at the intracellular entrance to a hyperpolarization-activated cation channel. *J.Gen.Physiol.* 119: 83-91
- Saiki K, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988) A primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- SambrookJ, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, Cold spring harbor, New York

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74:5463-5467

Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA (2000) Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J.Neurosci.* 20: 5264-5275

Santoro B, Grant SGN, Bartsch D, Kandel ER (1997) Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94: 14815-14820

Santoro B, Liu DT, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR (1998) Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93: 717-729

Schulze-Bahr E, Neu A, Friedrich P, Kaupp UB, Pongs O, Isbrandt D (2001) A mutation in the cardiac pacemaker channel gene causes sinus node dysfunction. *Circulation.* 104: II-192 (Abstr.)

Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB (1999) Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96: 9391-9396

Shi W, Wymore R, Yu H (1999) Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ.Res.* 85: E1-E6

Shin KS, Rothberg BS, Yellen G (2001) Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J.Gen.Physiol.* 117: 91-101

Southern PJ, Berg P (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J.Mol.Appl.Gen.* 1: 327-341

Stevens DR, Seifert R, Bufe B, Müller F, Kremmer E, Gauss R, Meyerhof W, Kaupp UB, Lindemann B (2001) Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* 413: 631-635

Stieber J, Herrmann S, Feil S, Löster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2003) The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 100: 15235-15240

Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K (1981) Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78: 6613-6617

Tibbs GR, Liu DT, Leybold BG, Siegelbaum SA (1998) State-independent interaction between ligand and a conserved arginine residue in cyclic nucleotide-gated channels reveals a functional polarity of the cyclic nucleotide binding site. *J.Biol.Chem.* 273: 4497-4505

Tran N, Proenza C, Macri V, Petigara F, Sloan E, Samler S, Accili EA (2002) A conserved domain in the N-terminus important for assembly and functional expression of pacemaker channels. *J.Biol.Chem.* 277: 43588-43592

Ulens C, Tytgat J (2001) Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J.Biol.Chem.* 276: 6069-6072

Ulmer TS, Yaspan B, Ginsberg MH, Campbell ID (2001) NMR analysis of structure and dynamics of the cytosolic tails of integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ in aqueous solution. *Biochemistry* 40:7498-7508

Vaca L, Stieber J, Zong X, Ludwig A, Hofmann F, Biel M (2000) Mutations in the S4 domain of a pacemaker channel alter its voltage dependence. *FEBS Lett.* 479: 35-40

Vemana S, Pandey S, Larsson HP (2004) S4 movement in a mammalian HCN channel. *J.Gen.Physiol.* 1: 21-32

Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A, DiFrancesco D (2001) C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J.Biol.Chem.* 276: 29930-29934

Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR (2001) Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411: 805-810

Wang J, Chen S, Siegelbaum SA (2001) Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J.Gen.Physiol.* 118: 237-250

Weber IT, Steitz TA (1987) Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5Å. *J.Mol.Biol.* 198: 311-326

Weiss B, Jaquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J.Biol.Chem.* 234: 4543-4555

Wilson FH, Disse-Nicodéme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP (2001) Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293: 1107-1112

Xue T, Marbán E, Li RA (2002) Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct. *Circ.Res* 90: 1267-1273

Yanagida H, Inoue R, Tanaka M, Ito (2000) Temperature-sensitive gating of cation current in guinea pig ileal muscle activated by hyperpolarization. *Am.J.Physiol.Cell.Physiol.* 278: C40-C48

Yanagihara K, Irisawa H (1980) Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflügers Arch.* 388: 11-19

Yellen G (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419: 35-42

Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El-Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, Wymore R (2001) MinK-Related Peptide 1. A β subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ.Res.* 88: 84e-87e

Yu H, Lu Z, Pan Z, Cohen IS (2003) Tyrosine kinase inhibition differentially regulates heterologously expressed HCN channels. *Pflügers Arch.* [Epub ahead of print]

Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EC, Olson R, Gouaux E (2003) Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 425: 200-205

Zhou Q, Ruiz-Lozano P, Martone M, Chen J (1999) Cypher, a striated muscle-restricted PDZ and LIM domain-containing protein, binds to α -actinin-2 and protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 274: 19807-19813

Zhou Q, Chu PH, Huang C, Cheng CF, Martone ME, Knoll G, Shelton GD, Evans S, Chen J (2001) Ablation of cypher, a PDZ-LIM domain Z-line protein, causes a severe form of congenital myopathy. *J.Cell Biol.* 155: 605-612

Zhou Y, Morais-Cabral JH, Kaufmann A, MacKinnon R (2001) Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* 414: 43-48

Zolnierowicz S (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* 60: 1225-1235

Zong X, Stieber J, Ludwig A, Hofmann F, Biel M (2001) A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J.Biol.Chem.* 276: 6313-6319

Zong X, Zucker H, Hofmann F, Biel M (1998) Three amino acids in the C-linker are major determinants of gating in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.* 17: 353-362

7.2 Eigene Veröffentlichungen

Michael Klein, Michael Friedrich, Andrew J. Roger, Philip Hugenholtz, Susan Fishbain, Heike Abicht, Linda L. Blackall, David A. Stahl and Michael Wagner (2001) Multiple lateral transfers of dissimilatory sulfite reductase genes between major lineages of sulfate-reducing prokaryotes. *J. Bacteriol.* 183: 6028-6035

8 LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name: Heike Kathrin Abicht
Geburtsdatum: 27.06.1974
Geburtsort München
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung

1980 - 1984 Grundschule an der Fasanenstraße, Unterhaching
1984 - 1993 Theodolindengymnasium, München

Berufsausbildung

Nov. 1993 - Okt. 1995 Grundstudium Biologie, TUM
Herbst 1995 Vordiplom
Nov. 1995 – März 1998 Hauptstudium Mikrobiologie, TUM
Frühjahr 1998 Hauptdiplom
Mai - Oktober 1998 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TUM:
„Untersuchungen zur Evolution der dissimilatorischen
Sulfitreduktase sulfatreduzierender Bakterien“
akademischer Grad: Dipl. Biol. (Univ.)

Berufserfahrung

Dez. 1998 – Dez. 1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der TUM
Mitarbeit an einem DFG-Projekt „Bioremediation of Marine
Pollutants by Cyanobacterial Mats – An Interdisciplinary
Approach“
Feb. 2000 – Jan. 2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl Pharmakologie für
Naturwissenschaften der LMU München mit dem Ziel der
Promotion